

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica



TESIS DOCTORAL

Polímeros bioactivos portadores de ibuprofeno

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Patricia Suárez Pérez

Directores

Julio San Román del Barrio
Luis Rojo del Olmo

Madrid, 2014

TESIS DOCTORAL

POLÍMEROS BIOACTIVOS PORTADORES DE IBUPROFENO

PATRICIA SUÁREZ PÉREZ

DIRECTORES

Julio San Román del Barrio

Luis Rojo del Olmo



**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS
Grupo de Biomateriales**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica**

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Orgánica



**POLÍMEROS BIOACTIVOS PORTADORES
DE IBUPROFENO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Patricia Suárez Pérez

Bajo la dirección de los doctores

Julio San Román del Barrio

Luis Rojo del Olmo

Madrid, 2014

El presente trabajo de investigación, titulado: **“Polímeros bioactivos portadores de ibuprofeno”** ha sido realizado en el Grupo de Biomateriales del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros del CSIC, bajo la dirección de los doctores D. Julio San Román del Barrio y D. Luis Rojo del Olmo para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

AGRADECIMIENTOS

Por fin, después de mucho tiempo aquí estoy escribiendo los agradecimientos de la tesis....algo que parecía que nunca iba a llegar.

Para empezar quiero darles las gracias a mis directores de tesis, Julio y Luis, por toda la ayuda prestada durante todos estos años que he trabajado con vosotros. Gracias por contad conmigo y haberme ofrecido la oportunidad de realizar esta tesis doctoral. Gracias a Luis, que a pesar de la distancia siempre ha estado disponible para ayudarme. A Julio por sus consejos y enseñanzas recibidas, por su confianza en el trabajo realizado y por los buenos momentos pasados. También quiero agradecerle a Blanca su ayuda y el estar siempre pendiente del trabajo.

Siempre recordaré los años que he estado trabajando en Biomateriales como de los mejores, donde he coincidido con excelentes personas tanto a nivel profesional como sobre todo personal y con las que he compartido muy buenos momentos dentro y fuera del laboratorio. Al grupo de Biomateriales muchas gracias: Curra, Gema, Mar (muchas gracias por toda la ayuda prestada con los ensayos celulares), Luisgar, Marisa, Luis Rodríguez, Belén, Diego, Fany, Lucena, Laura, Jorge, Joana, Leila, Hazel, Raúl, Rodrigo, Pablo, Tiago, y a todo aquel que como yo, ha tenido la suerte de trabajar en el grupo de Biomateriales.

En estos años no sólo he conseguido esta tesis, sino también verdaderos amigos, de los de “para toda la vida”, con los que he compartido algunos de los momentos más importantes y felices de mi vida. En primer lugar quiero darle las gracias a Álvaro, con el que haber trabajado mano a mano ha sido de lo mejor. Gracias por todo, tus buenos consejos, tu infinita paciencia, ánimos para seguir adelante y por la ayuda prestada hasta el final. Mil

gracias. A Paco, gracias a él hemos aprendido (sé que no soy la única) muchas cosas de química orgánica y de trabajo en el laboratorio. Y como no, a mis chicas, “las mejores de Biomateriales”: Sandra, Lorena, Feli, Paula y Raquel. Nada hubiese sido lo mismo sin ellas. Gracias a vosotras por todos los buenos ratos que pasamos juntas, dentro y fuera del laboratorio y que han sido muchísimos. Gracias por estar ahí siempre, por todo vuestro cariño, simpatía, comprensión y que a pesar de la distancia que actualmente nos separa y no poder vernos tanto como nos gustaría, sé que puedo contar con vosotras para lo que haga falta.

Gracias también a Juan Parra por su ayuda con los estudios celulares, y por sus visitas guiadas por Ávila. A David, por todos esos ratos ayudando a buscar unas famosas “bolitas”. A compañeros del ICTP como Miriam, Serena, Aurora, Jon, Coro, Vanesa y a mis compañeros de máster, que ayudaron a llevar un poco mejor un año un poco durillo.

A mis compañeros otros trabajos: al grupo de Pfizer, al de Famar y especialmente a mis compis del C-XIII.

Y sobre todo quiero darle las gracias a mi familia, especialmente a mis padres y a Juan Pedro. Gracias a mis padres por ser como son y por haberme educado y haberme dado la posibilidad de poder estudiar, por vuestros consejos, por vuestro apoyo incondicional, por vuestro cariño y mimos. Si hay alguien que sé que confía en mí sois vosotros. Y a ti Juanpe por todo, porque sin ti nada sería igual. Gracias por haberme animado y empujado a terminar la tesis, por escuchar mis problemas y ayudarme a solucionarlos. Por estar siempre pendiente de mí. Ya lo sabes, somos un equipo!!!

Y para terminar quiero dedicarle unas palabras a la persona más importante de mi vida, a mi pequeña, a Elena. Cuando sea mayor le pondré de ejemplo esta tesis para enseñarle cómo con mucho trabajo y esfuerzo (incluso cuando ella estaba en mi barriga) uno puede conseguir lo que se proponga.

GRACIAS A TODOS.

Parte de los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo han dado lugar a la siguiente publicación y patente:

- Patricia Suárez, Luis Rojo, Álvaro González-Gómez, Julio San Roman. Self-Assembling Gradient Copolymers of Vinylimidazole and (Acrylic)ibuprofen With Anti-Inflammatory and Zinc Chelating Properties. *Macromolecular Bioscience*, **2013**, *9*, 1174-1184.
- Patricia Suárez Pérez, Álvaro González Gómez, Luis Rojo del Olmo, Julio San Román del Barrio, Luis Duocastella Codina, María Molina Crisol. Compuestos poliméricos bioactivos nanoestructurados derivados de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) e imidazol. Patente española ES2391187B1. 2013.

ÍNDICE

Índice	1
Abreviaturas	9
Capítulo 1. Introducción	13
1.1.- Sistemas de liberación controlada de fármacos.....	15
1.2.- AINEs e inflamación. Mecanismo de acción. Ibuprofeno.....	18
1.3.- Liberación controlada de AINEs. Vectorización de AINEs.....	23
1.4.- Estrategias alternativas para el tratamiento de inflamación: metaloproteinasas de matriz.....	27
1.5.- Bibliografía.....	29
Capítulo 2. Objetivos	37
Capítulo 3. Materiales y métodos	41
3.1.- Reactivos.....	43
3.2.- Síntesis y caracterización del monómero derivado de ibuprofeno (HEI):	
3.2.1.- Síntesis del monómero HEI.....	43
3.2.2.- Caracterización del monómero HEI.....	44
3.3.- Síntesis de sistemas poliméricos derivados de ibuprofeno:	
3.3.1.- Síntesis de copolímeros de gradiente p(HEI-co-VI)	45
3.3.2.- Síntesis de copolímeros hidrófobos derivados de ibuprofeno.....	46
3.4.- Caracterización de sistemas poliméricos derivados de ibuprofeno:	
3.4.1.- Técnicas espectroscópicas.....	47
3.4.2.- Técnicas cromatográficas.....	48
3.4.3.- Técnicas calorimétricas.....	48

3.4.4.- Cálculo de las relaciones de reactividad de HEI y VI.	49
3.4.5.- Recubrimiento de stents vasculares con los copolímeros hidrófobos derivados de ibuprofeno.....	50
3.4.6.- Comportamiento <i>in vitro</i> de sistemas poliméricos derivados de ibuprofeno:	
3.4.6.1.- Determinación del ángulo de contacto.....	51
3.4.6.2.- Liberación de ibuprofeno.....	51
3.4.7.- Estudios de biocompatibilidad <i>in vitro</i> :	
3.4.7.1.- Ensayo MTT.....	52
3.4.7.2.- Ensayo Alamar Blue.....	54
3.4.7.3.- Evaluación mediante microscopía electrónica (SEM).....	54
3.5.- Nanopartículas bioactivas a partir de copolímeros p(HEI-co-VI):	
3.5.1.- Preparación de nanopartículas.....	55
3.5.2.- Caracterización de nanopartículas. Comportamiento <i>in vitro</i> :	
3.5.2.1.- Determinación de la constante de ionización (pK).....	56
3.5.2.2.- Propiedades hidrodinámicas superficiales: distribución de tamaño de partícula y potencial zeta. Influencia del pH.....	57
3.5.2.3.- Examen morfológico y de tamaño mediante microscopía electrónica (SEM y TEM).....	57
3.5.2.4.- Capacidad quelante de iones Zn^{2+}	58
3.5.2.5.- Liberación de ibuprofeno.....	59
3.5.2.6.- Estudios de biocompatibilidad <i>in vitro</i> :	
3.5.2.6.1.- Concentración inhibitoria al 50% (IC50).....	60
3.5.2.6.2.- Evaluación de la capacidad antiinflamatoria.....	60
3.6.- Bibliografía.....	63

Capítulo 4. Copolímeros de gradiente derivados de ibuprofeno y 1-vinilimidazol.....	65
4.1.- Introducción:	
4.1.1.- Conceptos generales de polimerización radical.....	67
4.1.2.- Relaciones de reactividad. RMN <i>in situ</i>	69
4.1.3.- Arquitectura molecular. Copolímeros de gradiente.....	75
4.1.4.- 1-vinilimidazol como monómero.....	79
4.2.- Síntesis del monómero HEI.....	81
4.3.- Caracterización del monómero HEI.....	85
4.4.- Síntesis de copolímeros de gradiente HEI-VI.....	88
4.5.- Caracterización de copolímeros de gradiente HEI-VI:	
4.5.1.- Técnicas espectroscópicas.....	89
4.5.2.- Cálculo relaciones de reactividad. Caracterización microestructural.....	94
4.5.3.- Técnicas cromatográficas.....	100
4.5.4.- Técnicas calorimétricas.....	101
4.5.5.- Comportamiento <i>in vitro</i> :	
4.5.5.1.- Ángulo de contacto.....	103
4.5.5.2.- Liberación de ibuprofeno.....	104
4.5.6.- Biocompatibilidad <i>in vitro</i> :	
4.5.6.1.- Ensayo MTT.....	108
4.5.6.2.- Ensayo Alamar Blue.....	110
4.6.- Bibliografía.....	112

Capítulo 5. Obtención de nanopartículas bioactivas a partir de copolímeros de gradiente derivados de ibuprofeno y 1-vinilimidazol.....	123
5.1.- Introducción.....	125
5.2.- Preparación de nanopartículas a partir de los copolímeros p(HEI-co-VI).....	132
5.3.- Caracterización de nanopartículas. Comportamiento <i>in vitro</i> :	
5.3.1.- Determinación de la constante de ionización (pK).....	133
5.3.2.- Propiedades hidrodinámicas superficiales: distribución de tamaño de partícula y potencial zeta. Influencia del pH.....	135
5.3.3.- Examen morfológico y de tamaño mediante microscopía electrónica (SEM y TEM).....	140
5.3.4.- Estudio de la capacidad quelante de iones Zn^{2+}	141
5.3.5.- Liberación de ibuprofeno.....	143
5.3.6.- Biocompatibilidad <i>in vitro</i>	
5.3.6.1.- Concentración inhibitoria al 50% (IC50).....	147
5.3.6.2.-Evaluación de la actividad antiinflamatoria.....	149
5.4.-Bibliografía.....	152

Capítulo 6. Copolímeros hidrófobos derivados de ibuprofeno para su aplicación en dispositivos vasculares.....	161
6.1.- Introducción.....	163
6.2.- Síntesis de copolímeros.....	171
6.3.- Caracterización de copolímeros	
6.3.1.- Técnicas espectroscópicas.....	172

6.3.2.- Técnicas cromatográficas.....	176
6.3.3.- Técnicas calorimétricas.....	177
6.3.4.- Recubrimiento de stents.....	179
6.3.5.- Comportamiento in vitro	
6.3.5.1.- Angulo de contacto.....	181
6.3.5.2.- Liberación de ibuprofeno.....	184
6.3.6.- Biocompatibilidad <i>in vitro</i>	
6.3.6.1.- Ensayo MTT.....	187
6.3.6.2.- Ensayo Alamar Blue.....	189
6.3.6.3.- Evaluación mediante microscopía electrónica....	190
6.4.- Bibliografía.....	192
 Capítulo 7. Resumen general y conclusiones.....	 199
 I. ANEXO I: Técnicas de caracterización de polímeros empleadas en este trabajo.....	 207
 II. ANEXO II: Summary and conclusions.....	 219

ABREVIATURAS

AB: acrilato de butilo

AIBN: 2,2'-azo-*bis*-isobutironitrilo

AINE: antiinflamatorio no esteroideo

ASA: ácido acetilsalicílico

ATC: angioplastia transluminal percutánea

ATR-FTIR: espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier por Reflectancia Total Atenuada

ATRP: polimerización radical de transferencia de átomo

CDCl₃: cloroformo deuterado

COX-1: ciclooxigenasa 1

COX-2: ciclooxigenasa 2

¹³C-RMN: Resonancia Magnética Nuclear de carbono-13

CRP: polimerización radical controlada

DCC: *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida

DES: stents liberadores de fármacos

DHU: diclohexilurea

DLS: Dispersión de Luz Dinámica

DMAP: 4-(dimetilamino)piridina

DMF: *N,N*-dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

DMSO-d₆: dimetilsulfóxido deuterado

DSC: calorimetría diferencial de barrido

EAC: enfermedad arterial coronaria

EMA: metacrilato de etilo

FBH: fibroblastos humanos

HEI: metacrilato de 2-((2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoil}oxi)etilo

HEMA: metacrilato de 2-hidroxietilo

HPLC: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

HUVECS: células endoteliales humanas obtenidas a partir de vena umbilical

^1H -RMN: Resonancia Magnética Nuclear de protón

IBU-Cl: cloruro de 2-[4-(2-metilpropil)fenil]propionilo

IC₅₀: concentración inhibitoria del 50%

IP: índice de polidispersidad

LPS: lipopolisacárido

MANSA: metacrilato del ácido 5-amino-2-naftalensulfónico

MEC: matriz extracelular

MMA: metacrilato de metilo

MMP: metaloproteinasas de matriz

M_n: Peso Molecular Promedio en Número

M_w: Peso Molecular Promedio en Peso

NMP: polimerización mediada por nitróxidos

NO: óxido nítrico

OAG: oleil-2-acetamido-2-deoxi- α -D-glucopiranosido

PAMAM: poli(amido amina)

PBS: tampón fosfato salino

PCL: poli(ϵ -caprolactona)

PEG: polietilenglicol

p(HEI): homopolímero de HEI

p(HEI-co-AB): copolímeros de HEI y AB

p(HEI-co-AB-co-MMA): copolímeros de HEI, AB y MMA

p(HEI-co-VI): copolímeros de HEI y VI

PGA: poli(ácido glicólico)

PLA: poli(ácido láctico)

PLGA: poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

PMMA: polimetacrilato de metilo

p(HEMA-co-AB): copolímeros de HEMA y AB

PVA: poli(alcohol vinílico)

RAFT: polimerización por adición-fragmentación y transferencia reversible

ROMP: polimerización metatética de apertura de anillo

SBF: suero fetal bovino

SEC: Cromatografía de Exclusión por Tamaños

SEM: Microscopía Electrónica de Barrido

SES: energía superficial del sólido

TEM: Microscopía Electrónica de Transmisión

THEMA: derivado metacrílico de Triflusal

Tg: temperatura de transición vítrea

TMX: Thermanox[®]

UV: ultravioleta

VC: viabilidad celular relativa

VI: 1-vinilimidazol

VP: *N*-vinilpirrolidona

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS

La constante demanda de nuevas y más eficaces formulaciones terapéuticas que proporcionen una mayor biodisponibilidad de principios activos, así como la preparación de sistemas de dosificación controlada, han motivado un aumento en el interés por el diseño y preparación de nuevos sistemas poliméricos portadores de fármacos, de tal forma que este campo de la química ha llegado a constituir una de las áreas más atractivas y prometedoras en la ciencia de los biomateriales.¹

La mayoría de sistemas convencionales de administración de fármacos muestran un perfil de liberación en el que se alcanza un valor máximo tras la dosis de éste, cayendo con el tiempo hasta un valor mínimo, siendo por tanto necesaria la administración de una nueva dosis (Figura 1.1). El diseño de los sistemas de liberación controlada de fármacos se centra en el desarrollo de perfiles constantes o sostenidos de liberación que eviten los problemas asociados a la administración convencional manteniendo una concentración efectiva constante, es decir, disminuyen la toxicidad derivada de la sobredosificación y asimismo constituyen una alternativa más cómoda para el paciente ya que se disminuye la toma de nuevas dosis. En este sentido la ciencia de materiales ha contribuido de manera significativa al desarrollo de nuevos sistemas avanzados de liberación controlada capaces a su vez de promover la vectorización hacia los tejidos y células diana donde deben realizar su función, mejorar la biodisponibilidad y distribución de fármacos poco solubles, conseguir el control de la velocidad de liberación del fármaco así como la liberación de más de un agente en una misma formulación. Todo ello ha sido posible gracias a la introducción de nuevos materiales poliméricos biocompatibles, al mejor conocimiento de las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de los medicamentos,

así como al progreso experimentado por las operaciones industriales necesarias para la fabricación de estas formulaciones.

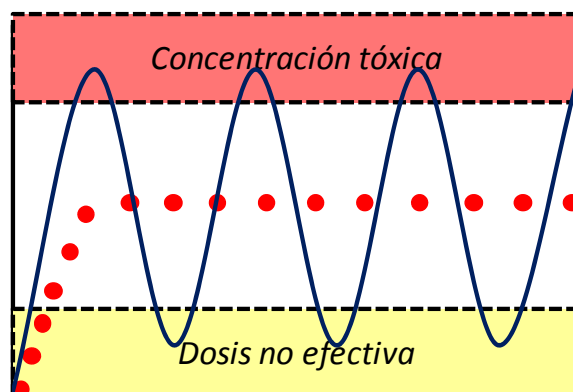


Figura 1.1. Perfil de dosificación tradicional de fármacos (—) frente al de liberación controlada (●).

Desde el punto de vista estructural los sistemas poliméricos para la liberación de fármacos pueden clasificarse de forma muy general en dos tipos: aquellos en los que el fármaco está disperso en una matriz polimérica (encapsulamiento físico) y aquellos en los que el fármaco se encuentra unido covalentemente a la cadena macromolecular (unión química), también llamados **conjugados poliméricos**.^{2,3} Estos últimos sistemas presentan una estructura general descrita según el modelo de Ringsdorf⁴ que considera que el enlace covalente que une el fármaco y el sistema polimérico debe establecerse a través de grupos funcionales que puedan ser hidrolizados en el medio fisiológico.

Como se muestra en la Figura 1.2 el modelo sugerido por Ringsdorf presenta tres componentes importantes que se pueden incorporar a sistemas macromoleculares mediante copolimerización de los correspondientes monómeros con la composición adecuada para producir la mejor acción terapéutica. El primer componente proporciona al sistema un carácter

hidrófilo o hidrófobo adecuado para el desempeño de la acción. Ejemplos de monómeros utilizados frecuentemente para este fin son el metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) o el metacrilato de metilo (MMA) entre otros, y cuya composición y distribución microestructural a lo largo de la cadena macromolecular consigue modular el carácter hidrófilo/hidrófobo del material. El segundo componente soporta al agente bioactivo y dota de funcionalidad al polímero. Consiste en unidades incorporadas a la cadena polimérica en la que el fármaco se une covalentemente, bien directamente o bien en los casos que sea necesario por medio de grupos separadores de cadena que aumentan la flexibilidad y la movilidad de la cadena lateral, disminuyendo el efecto estérico de los grupos vecinos, facilitando así la acción farmacológica del principio anclado. En general, los grupos separadores son segmentos oxietilénicos para sistemas hidrófilos y cadenas hidrocarbonadas para sistemas hidrófobos, siendo necesario que el grupo espaciador que une el fármaco al resto de la cadena posea en su estructura un enlace susceptible de ser hidrolizado en el medio fisiológico, principalmente de tipo éster, anhídrido, carbonato, uretano o amida.^{5,6} La finalidad del tercer componente es conseguir la vectorización de la molécula proporcionándole una funcionalidad adicional. La presencia de estos grupos confiere al conjunto un determinado control sobre el mecanismo de degradación, solubilidad y liberación del fármaco.

La química macromolecular proporciona un sinnúmero de posibilidades a la hora de obtener polímeros funcionalizados dotados de propiedades específicas. La preparación de sistemas poliméricos de liberación controlada de fármacos unidos covalentemente a la cadena macromolecular, en los que la liberación del mismo se produce en medios fisiológicos por ruptura del enlace, se puede llevar a cabo por polimerización de un monómero que incorpore la especie activa o bien por modificación química del polímero para unir el fármaco de interés.⁷ Esta última vía de preparación presenta varios inconvenientes como ausencia de reactividad y bajo rendimiento de

reacción. El diseño de sistemas poliméricos de control químico portadores de fármacos constituye una de las principales líneas de investigación desarrolladas en nuestro grupo de trabajo, habiéndose obtenido resultados interesantes con diferentes tipos de fármacos, por ejemplo antiagregantes plaquetarios^{8,9} o antiinflamatorios.^{5,10,11}

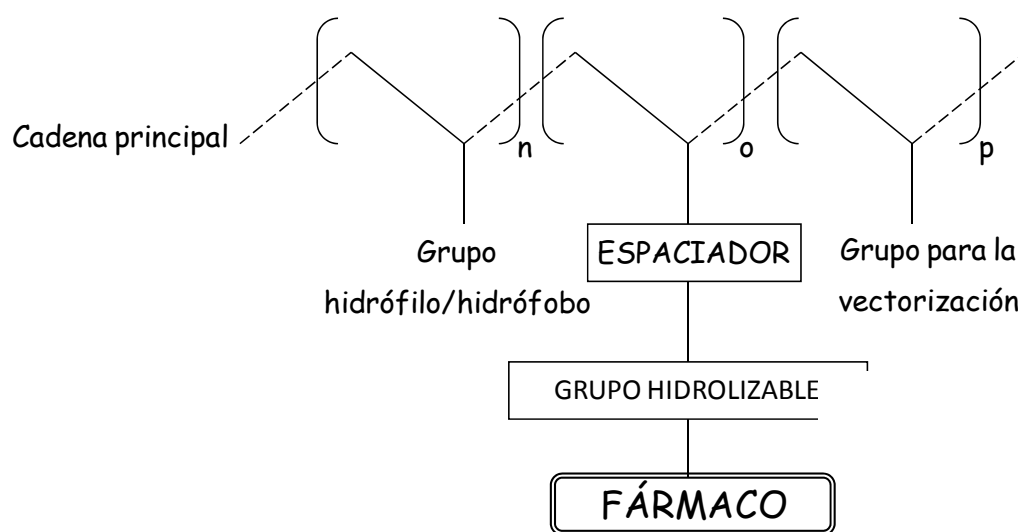


Figura 1.2. Sistema polímero-fármaco según el modelo de Ringsdorf.

1.2 AINEs E INFLAMACIÓN. MECANISMO DE ACCIÓN. IBUPROFENO

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son un grupo químicamente heterogéneo de fármacos con efecto antiinflamatorio, analgésico y antipirético que reducen los síntomas de la inflamación y alivian el dolor y la fiebre. La historia de los AINEs se inició con la síntesis del ácido acetilsalicílico (ASA), principio activo de la aspirina®, por parte de Felix Hoffman en 1897. A partir de entonces comenzó el desarrollo de esta

nueva clase de fármacos hoy denominados genéricamente como AINEs. Según su estructura química, pueden ser clasificados en:

- Salicilatos: ASA, salicilamida, ácido salicílico.
- Derivados del *p*-aminofenol: acetaminofen (paracetamol).
- Indoles: acemetacina, indometacina.
- Derivados aril-acéticos: diclofenaco.
- Derivados arilpropiónicos: ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno.
- Fenamatos: ácido meclofenámico, ácido mefenámico.
- Ácidos enólicos: meloxicam, piroxicam.

- **Fisiología de la inflamación. Mecanismo de acción de AINEs.**

La inflamación es la respuesta defensiva del organismo frente a un agente irritante o infeccioso caracterizada por el movimiento de células y fluidos desde la sangre hacia los tejidos extravasculares del lugar en el que se ha iniciado el estímulo nocivo. Esta reacción tiene como objetivo destruir, atenuar o mantener localizado al agente patógeno, iniciar una cadena de acontecimientos que ayuden a curar y reconstruyan el tejido lesionado así como evitar que las infecciones se propaguen de forma incontrolada.

La respuesta inflamatoria se produce en tres fases características, cada una de las cuales parece estar mediada por mecanismos diferentes: primero, una fase aguda transitoria que se caracteriza por una vasodilatación local y aumento de la permeabilidad capilar, seguida de una fase aguda retardada cuya característica es la infiltración por leucocitos y fagocitos, y una tercera fase crónica proliferativa, en la que se produce degeneración tisular y fibrosis.^{12,13}

El proceso inflamatorio se inicia con una etapa tipo vascular que consiste en la dilatación de los capilares de la zona y el aumento del flujo

sanguíneo, lo que provoca calor y rubor en la zona inflamada. Esta vasodilatación es provocada por varios mediadores químicos producidos por células del tejido circundante, como por ejemplo la histamina, las prostaglandinas y el factor activador de plaquetas. De todos los factores citados se considera a las prostaglandinas como los más importantes, por lo que la inhibición de su biosíntesis es el principal mecanismo de acción de los antiinflamatorios y en especial de los AINEs. Las prostaglandinas se sintetizan a partir del ácido araquidónico cuando éste es liberado a partir de la hidrólisis de fosfolípidos de membrana y mediante la acción de la enzima fosfolipasa activada tras la agresión del tejido, tal y como vemos en el esquema de la Figura 1.3. El ácido araquidónico actúa como sustrato de varias enzimas, si bien la vía de las ciclooxigenasas y lipooxigenasas son las rutas metabólicas oxidativas mayoritarias, de forma que la ciclooxigenasa cataliza la oxidación del ácido araquidónico obteniéndose prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos, y la lipooxigenasa cataliza la peroxidación formando los leucotrienos.¹⁴⁻¹⁶

Las prostaglandinas poseen un papel importante en la fisiología normal y su formación está mediada por la enzima ciclooxigenasa, la cual presenta dos isoformas con funciones muy diferenciadas. La ciclooxigenasa 1 (COX-1) es una enzima constitutiva y está presente en la mayoría de las células del organismo. Las prostaglandinas generadas por la COX-1 proporcionan una serie de efectos fisiológicos normales y permanentes, por ejemplo a nivel gástrico preservan el mucus gástrico y por lo tanto la integridad de la mucosa del estómago, a nivel renal provocan vasodilatación permitiendo un buen flujo renal y a nivel plaquetario promueven la agregación evitando el sangrado excesivo. La otra isoforma de la enzima ciclooxigenasa es la ciclooxigenasa 2 (COX-2), que no está presente normalmente, sino que es una enzima inducida por el proceso inflamatorio, la cual estimula la formación de prostaglandinas que producirán fiebre, dolor e inflamación.¹⁷⁻²⁰

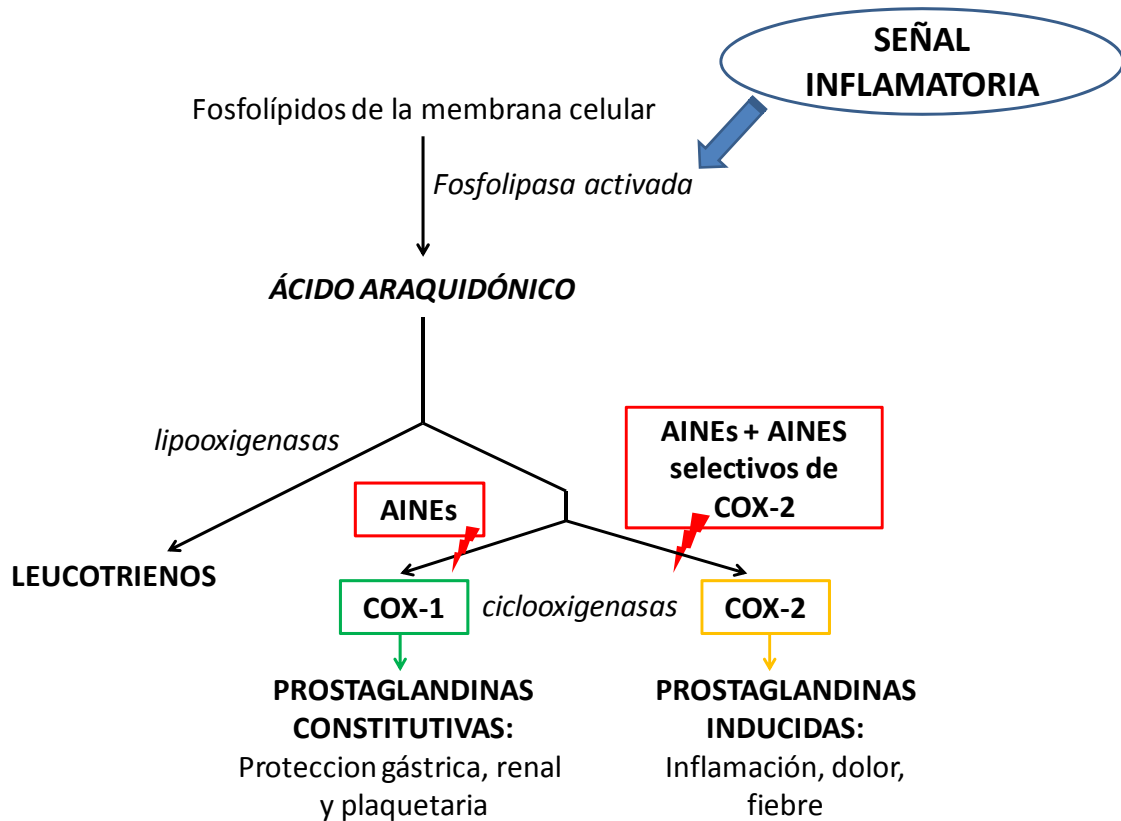


Figura 1.3. Detalle de la biosíntesis del ácido araquidónico e inhibición de prostaglandinas por AINEs.

Los AINEs bloquean el primer paso de la síntesis de prostaglandinas uniéndose e inhibiendo las ciclooxigenasas (Figura 1.3). Sin embargo, no pueden inhibir la vía de la lipooxigenasa, por lo que la cascada del ácido araquidónico se desvía hacia la formación de los leucotrienos, otros mediadores activos de la inflamación, lo que explica la limitación de estos fármacos para controlar los procesos en los que intervienen numerosos mediadores.

Dentro del grupo de AINEs la mayoría de ellos inhiben ambas isoformas y algunos son selectivos de una de ellas, de forma que la selectividad sobre cada una de las isoformas de las ciclooxigenasas nos da una cierta idea del efecto farmacológico de éstos y proporciona la base para

evaluar la seguridad y eficacia relativa. Así, un fármaco con inhibición selectiva sobre la COX-2 se considera más seguro ya que conserva las propiedades antiinflamatorias de los AINEs minimizando los efectos adversos, en especial los gastrointestinales y renales provocados por la inhibición de la COX-1.^{21,22} De esta forma los AINEs pueden ser clasificados también según su selectividad por el receptor (COX-1 o COX-2), siendo:

- Selectivos de COX-1: aspirina (sólo en bajas dosis).
- Selectivos de COX-2: celecoxib, meloxicam.
- No selectivos (inhiben COX-1 y COX-2): ibuprofeno, naproxeno, indometacina, ketoprofeno.

Dado que los sistemas de estudio objeto de este trabajo se basan en el ibuprofeno, a continuación se describe este fármaco con más detalle.

• Ibuprofeno

El ibuprofeno es un fármaco AINE que posee una eficaz actividad antiinflamatoria, antipirética y analgésica. Es un derivado del ácido propiónico, exactamente el ácido 2-(4-isobutilfenil)propiónico (Figura 1.4), con fórmula empírica $C_{13}H_{18}O_2$ y peso molecular de 206 g/mol, que se presenta en forma de cristales blancos con un punto de fusión entre 75 y 77 °C y una baja solubilidad en agua (<1mg/ml).²³⁻²⁵ El ibuprofeno fue desarrollado por la división de investigación del grupo Boots durante los años sesenta. Fue descubierto por Stewart Adams y John Nicholson, patentado en 1961 y lanzado como tratamiento para la artritis reumatoide en el Reino Unido en 1969 y en Estados Unidos en 1974, llegando a ser uno de los medicamentos más famosos de la historia y probablemente la molécula más estudiada clínicamente de entre todos los AINEs^{26,27} junto con el ASA.

El ibuprofeno presenta en su estructura un carbono quiral, siendo la forma enantiomérica denominada (+)-*S* la que tiene actividad farmacológica, mientras que el enantiómero (-)-*R* carece de ella. Es el cuerpo humano el que mediante reacciones enzimáticas transforma dicho enantiómero (-)-*R* en la forma (+)-*S* activa.

El ibuprofeno inhibe la síntesis y liberación de prostaglandinas en los tejidos corporales por inhibición de la COX-1 y COX-2, dando lugar, como ya hemos explicado, a una disminución de la formación de precursores de las prostaglandinas y de los tromboxanos.^{28,29} Inhibe de manera reversible la agregación plaquetaria, pero menos que el ASA.³⁰

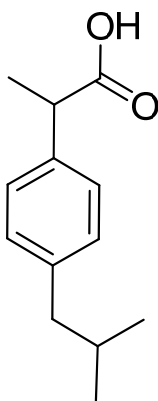


Figura 1.4. Estructura química del ibuprofeno.

1.3 LIBERACIÓN CONTROLADA DE AINEs. VECTORIZACION DE AINES

El uso de biomateriales poliméricos para la vectorización de fármacos AINEs ha sido extensamente estudiado. Estos sistemas se basan generalmente en el encapsulamiento físico de dichos compuestos para su

liberación mediante procesos de difusión.³¹⁻³⁵ Un grupo de AINEs particularmente deseables para su vectorización son los llamados de Clase 2, según el Sistema de Clasificación de Agentes Biofarmacéuticos propuesto por Amidon³⁶ y col., entre los que se incluye el ibuprofeno, caracterizados por presentar una permeabilidad gastrointestinal razonablemente buena pero una baja o nula solubilidad acuosa, por lo que su absorción queda limitada por su velocidad de disolución.

En la actualidad existen distintas formulaciones farmacéuticas destinadas a aumentar la biodisponibilidad de dichos AINEs mediante administración oral como por ejemplo los Sistemas de Administración de Fármacos Autoemulsionable (SEDDS) (patente española nº ES2253354) basados en un preconcentrado de emulsión que comprende un derivado de AINE (naproxeno) y uno o más surfactantes capaces de formar una emulsión *in situ* en contacto con el medio gastrointestinal.

Otra estrategia desarrollada en los últimos años y que ha conseguido excelentes resultados consiste en el encapsulamiento físico de fármacos AINEs en matrices y/o vehículos micro y nanoestructurados de origen polimérico para su uso como sistemas de liberación controlada que consiguen mejorar la solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad de este tipo de fármacos poco solubles en el medio fisiológico. Así, Senel et al. describen el uso de dendrímeros de poli(amido amina) (PAMAM) con núcleo de óxido de polipropileno en el que se encapsula el fármaco consiguiendo aumentar la solubilidad del AINE.³⁷ Otro ejemplo son las nanopartículas poliméricas de p(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) cargadas de diclofenaco que mejoran la biodisponibilidad del fármaco para su aplicación a nivel ocular.³⁸ Los numerosos ejemplos que encontramos en la bibliografía de este tipo de sistemas nos da una clara idea de la importancia de los mismos y de las significativas ventajas y éxitos que han conseguido como sistemas de liberación controlada de AINEs.³⁹⁻⁴²

Métodos más avanzados se basan en la incorporación de fármacos o moléculas de interés biológico mediante el anclaje químico a sistemas poliméricos capaces de promover la vectorización y/o liberación controlada del compuesto biológicamente activo mediante procesos de hidrólisis, todos ellos basados en el modelo de Ringsdorf explicado anteriormente. Por ejemplo, Babazadeh et al. describen la síntesis de polímeros bioactivos por unión covalente de AINEs (diclofenaco, ibuprofeno y ketoprofeno) a polímeros metacrílicos a través de enlaces tipo éster⁴³ y a polímeros vinílicos mediante enlaces tipo amida.⁴⁴ Bédouet et al. describen la preparación de micresferas de carácter antiinflamatorio formadas por polimerización de un derivado metacrílico de ibuprofeno y polietilenglicol (PEG) para ser aplicadas como sistemas inyectables que presentan un perfil de liberación controlado del fármaco y consiguen la inhibición de la síntesis de prostaglandinas.⁴⁵ Otro ejemplo son los copolímeros de bloque anfífilicos sintetizados por polimerización tipo RAFT de un derivado de ibuprofeno y PEG, capaces de autoensamblarse en medio acuoso y formar micelas poliméricas con carácter antiinflamatorio.⁴⁶ Por último citar los derivados poliméricos desarrollados recientemente en nuestro grupo de investigación y descritos en la patente española ES2154242 con aplicabilidad en el campo de la cirugía vascular y cinéticas controladas de liberación de fármacos derivados de ácido salicílico, los cuales han alcanzado un gran éxito al ser usados como recubrimientos de stents vasculares comercializados actualmente.

Una de las principales líneas de investigación de nuestro grupo de trabajo es el desarrollo de este tipo de conjugados poliméricos con actividad farmacológica.⁴⁷⁻⁵¹ El presente trabajo se basa concretamente en la síntesis de un monómero metacrílico derivado de ibuprofeno denominado HEI con el fin de ampliar el estudio de sus propiedades farmacocinéticas y evaluar sus posibles aplicaciones en el campo biomédico mediante su incorporación a dispositivos médicos avanzados. Este monómero ya había sido sintetizado

previamente en nuestro grupo de investigación y se había evaluado la influencia del grupo espaciador a través del cual está unido el fármaco a la cadena polimérica en el perfil de liberación^{5,10}.

El monómero HEI se sintetiza a partir del ibuprofeno y del HEMA, monómero ampliamente usado en el área de los biomateriales al proporcionar copolímeros altamente biocompatibles debido a su baja toxicidad y alta estabilidad. Entre sus aplicaciones cabe destacar el uso de copolímeros de HEMA en lentes de contacto, sistemas cicatrizantes, recubrimientos hemocompatibles, prótesis quirúrgicas, membranas de diálisis, córneas artificiales, etc.⁵¹⁻⁵⁴ El HEMA constituye en el monómero HEI el grupo espaciador hidrolizable que une el ibuprofeno al resto de la cadena macromolecular, permitiendo la liberación del fármaco a través de la hidrólisis del grupo éster.

El trabajo desarrollado no sólo consigue optimizar la síntesis de dicho monómero, sino que gracias a las posibilidades que nos ofrece la química macromolecular, es posible la preparación de diferentes tipos de formulaciones terapéuticas con un gran control tanto en su estabilidad, en la cinética de liberación de ibuprofeno, aplicabilidad y actividad biológica, tal y como se irá exponiendo a lo largo de la presente memoria.

1.4 ESTRATEGIAS ALTERNATIVAS PARA EL TRATAMIENTO DE INFLAMACION: METALOPROTEINASAS DE MATRIZ

Como se ha comentado anteriormente el tratamiento del dolor asociado a procesos inflamatorios puede ser abordado desde distintas perspectivas, siendo la administración (generalmente por vía oral) de fármacos tipo AINE el tratamiento más utilizado. Una estrategia más avanzada, pero aún en fase de investigación, consiste en la administración de sustancias inhibitoras de las metaloproteinasas de matriz (MMP, Matrix Metalloproteinase) asociadas a procesos inflamatorios.⁵⁵⁻⁵⁸

Las MMP, también denominadas ‘matrixinas’, constituyen una familia de al menos 25 enzimas proteolíticas (endopeptidasas) dependientes de zinc que degradan prácticamente todos los componentes proteicos de la matriz extracelular (MEC).⁵⁹⁻⁶⁰ Son secretadas en forma latente y requieren ser activadas para llevar a cabo su acción proteolítica. Por su funcionalidad y según el sustrato que son capaces de degradar, se pueden agrupar en seis subfamilias: colagenasas, gelatinasas, estromelisin, matrilisinas, MMP de membrana y metaloelastasas.⁶¹⁻⁶³

Todas las MMP tienen en su estructura tres regiones o dominios diferentes: el dominio propéptido (predominio), el dominio catalítico y el extremo carboxiterminal, cada uno de ellos con una función específica (Figura 1.5). Se ha demostrado que el paso primordial en la activación de la forma latente de las MMP se basa en el mecanismo ‘llave’ de la cisteína, de manera que la proteólisis y la escisión del propéptido desestabiliza la unión cisteína-Zn²⁺ y convierten la MMP en su forma activa.^{60,64} Dado que la activación de las MMP requiere la presencia de zinc,^{65,66} la acción catalítica de las MMP es inhibida por agentes quelantes de dicho metal (Figura 1.6).

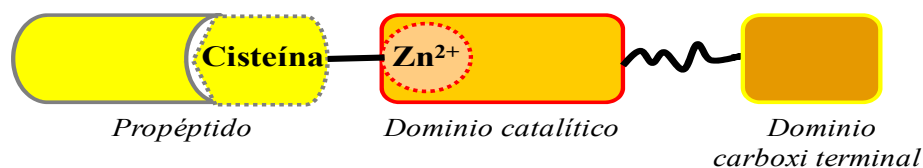


Figura 1.5. Estructura general de las metaloproteinasas de matriz (MMP).

Durante los últimos años se han logrado grandes avances en la investigación de MMP, como el estudio de su regulación, especificidad, determinación de su estructura así como el diseño de inhibidores sintéticos. Estos agentes inhibidores sintéticos se componen generalmente de moléculas orgánicas que presentan en su estructura heteroátomos con pares de electrones libres, generalmente nitrógeno, con capacidad de formar complejos metálicos con los iones necesarios para la activación de dichas MMP. Así, en la bibliografía se encuentran varios ejemplos de inhibidores de MMP^{65,67-70} entre los que destacamos los derivados de imidazol⁷¹ para su aplicación en el tratamiento de enfermedades del corazón, esclerosis múltiple o artritis reumatoide entre otras.

El uso de sistemas macromoleculares con capacidad quelante de metales involucrados en la actividad de MMP ha sido descrito en diversos trabajos. Por ejemplo, en la referencia de Tegoni et al. se describen sistemas poliméricos basados en derivados de α -aminoácidos capaces de reducir la concentración de iones Cu^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} , y por tanto susceptibles de interferir en la actividad de dichas MMP.⁶⁸ En el trabajo de Nakayama et al. se detalla la preparación de un copolímero hidrófobo derivado del metacrilato de *n*-butilo y de un monómero vinílico sintético inhibidor de MMP para su aplicación como recubrimiento de stents que reduce el riesgo de restenosis tras la implantación de dicho dispositivo.⁷²

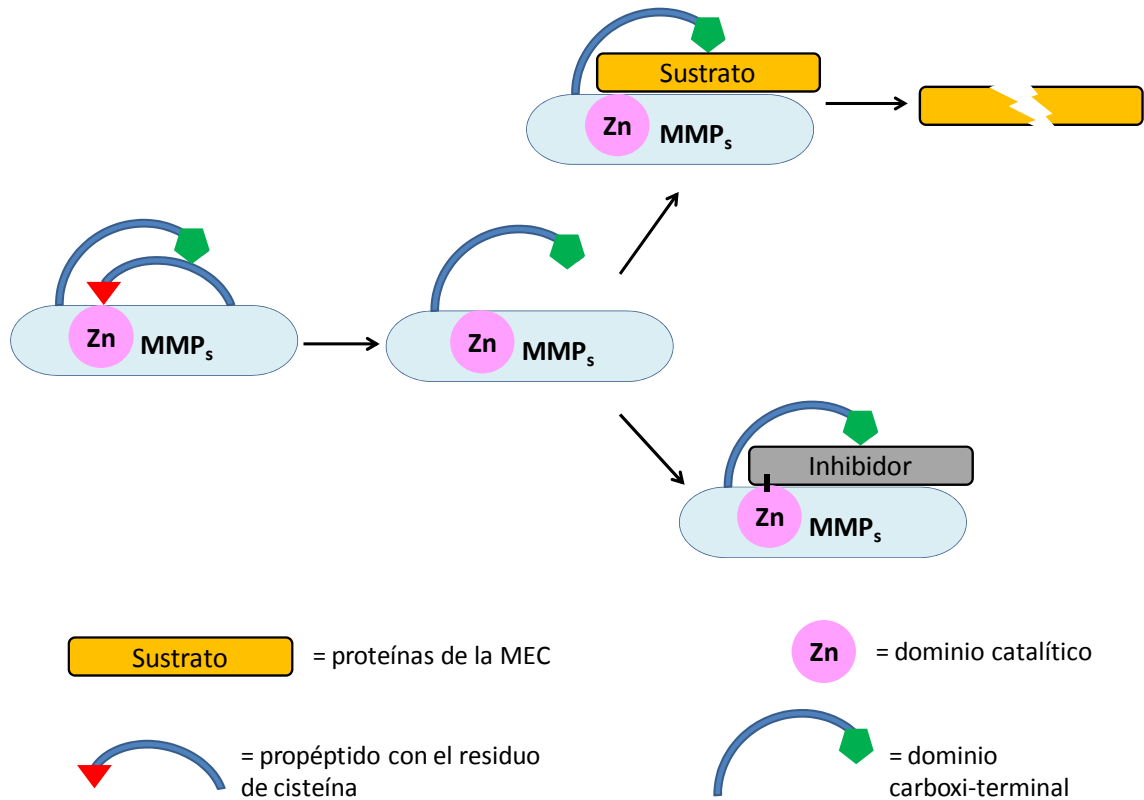


Figura 1.6. Representación general de la activación (parte superior) e inhibición (parte inferior) de las MMP.

1.5 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Dumitriu, S., *Polymeric Biomaterials*. Dekker. **1994**. Nueva York.
- ² Hoste, K.; De Winne, K.; Schacht, E. *International Journal of Pharmaceutics*, **2004**, *277*, 119-131.
- ³ Khandare, J.; Minko, T. *Progress in Polymer Science*, **2006**, *31*, 359-397.
- ⁴ Ringsdorf, H. *Journal of Polymer Science Symposia*, **1975**, *51*, 135-153.

- ⁵ Gallardo A.; Parejo, C.; San Román, J. *Journal of Controlled Release*, **2001**, *71*, 127-140.
- ⁶ Lewis, D.H. *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*. Dekker. **1991**. Nueva York.
- ⁷ Hastings, G.W. *Polymer*, **1985**, *26*, 1331-1335.
- ⁸ Rodríguez, G.; Fernández-Gutiérrez, M.; Parra, J.; López-Bravo, A.; Honduvilla, N.G.; Buján, J.; Molina, M.; Duocastella, L.; San Román, J. *Biomacromolecules*, **2010**, *11*, 2740-2747.
- ⁹ Rodríguez, G.; Fernández-Gutiérrez, M.; Parra, J.; López-Bravo, A.; Molina, M.; Duocastella, L.; San Román, J. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, **2012**, *27*, 550-564.
- ¹⁰ Parejo, C.; Gallardo, A.; San Román, J. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **1998**, *9*, 803-809.
- ¹¹ Parejo, C.; Gallardo, A.; San Román, J. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, **2000**, *11*, 1429-1441.
- ¹² Libby, P.; Ridker, P.M.; Maseri, A. *Circulation*, **2002**, *105*, 1135-1143.
- ¹³ Medzhitov, R. *Cell*, **2010**, *140*, 771-776.
- ¹⁴ Ricciotti, E.; Fitzgerald, G.A. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **2011**, *31*, 986-1000.
- ¹⁵ Scher, J.U.; Pillinger, M.H. *Journal of Investigative Medicine*, **2009**, *57*, 703-708.
- ¹⁶ Bahde, R.; Kapoor, S.; Gupta, S. *Experimental and Molecular Pathology*, **2014**, *96*, 27-35.

- ¹⁷ Morita, I. *Prostaglandins and other Lipid Mediators*, **2002**, *68*, 165-175.
- ¹⁸ Hawkey, C.J. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, **2001**, *15*, 801-820.
- ¹⁹ Hla, T.; Neilson, K. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1992**, *89*, 7384-7388.
- ²⁰ Burian, M.; Geisslinger, G. *Pharmacology and Therapeutics*, **2005**, *107*, 139-154.
- ²¹ Wallace, J.L.; McKnight, W.; Reuter, B.K.; Vergnolle, N. *Gastroenterology*, **2000**, *119*, 706-714.
- ²² Warner, T.D.; Giuliano, F.; Vojnovic, I.; Bukasa, A.; Mitchell, J.A.; Vane, J.R. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1999**, *96*, 7563-7568.
- ²³ Rainsford, K.D. *Inflammopharmacology*, **2009**, *17*, 275-342.
- ²⁴ Yiyun, C.; Tongwen, X. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2005**, *40*, 1188-1192.
- ²⁵ Filippa, M.A.; Gasull, E.I. *Fluid Phase Equilibria*, **2013**, *354*, 185-190.
- ²⁶ Adams, S.S. *Journal of Clinical Pharmacology*, **1992**, *32*, 317-323.
- ²⁷ Organización Mundial de la salud. *18th WHO Model List of Essential Medicines*, **2013**.
- ²⁸ Nanau, R.M.; Neuman, M.G. *Translational Research*, **2010**, *155*, 275-293.
- ²⁹ Van Hecken, A.; Schwartz, J.I.; Depre, M.; De Lepeleire, I.; Dallob, A.; Tanaka, W.; Wynants, K.; Buntinx, A.; Arnout, J.; Wong, P.H.; Ebel, D.L.; Gertz, B.J.; De Schepper, P.J. *Journal of Clinical Pharmacology*, **2000**, *40*, 1109-1120.

³⁰ Rao, G.H.; Johnson, G.G.; Reddy, K.R.; White, J.G. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **1983**, *3*, 383-388.

³¹ Rives, V.; Del Arco, M.; Martín, C. *Journal of Controlled Release*, **2013**, *169*, 28-39.

³² Caballero, F.; Foradada, M.; Miñarro, M.; Pérez-Lozano, P.; García-Montoya, E.; Ticó, J.R.; Suñé-Negre, J.M. *International Journal of Pharmaceutics*, **2014**, *460*, 181-188.

³³ Andrade-Vivero, P.; Fernández-Gabriel, E.; Álvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2007**, *96*, 802-813.

³⁴ Wei, J.; Shi, J.; Zhang, J.; He, G.; Pan, J.; He, J.; Zhou, R.; Guo, L.; Ouyang, L. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2013**, *21*, 4192-4200.

³⁵ Kundu, T.; Mukherjee, K.; Biswanath, S. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, **2012**, *5*, 103-113.

³⁶ Amidon, G.L.; Lennernäs, H.; Shah, V.P.; Crison, J.R. *Pharmaceutical Research*, **1995**, *12*, 413-420.

³⁷ Koc, F.E.; Senel, M. *International Journal of Pharmaceutics*, **2013**, *451*, 18-22.

³⁸ Agnihotri, S.M.; Vavia, P.R. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **2009**, *5*, 90-95.

³⁹ Howard, M.D.; Hood, E.D.; Zern, B.; Shuvaev, V.V.; Grosser, T.; Muzykantov, V.R. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **2014**, *54*, 205-226.

- ⁴⁰ Narayanan, D.; Geena, M.G.; Lakshmi H.; Koyakutty, M.; Nair, S.; Menon, D. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **2013**, *9*, 818-828.
- ⁴¹ Lamanna, G.; Russier, J.; Dumortier, H.; Bianco, A. *Biomaterials*, **2012**, *33*, 5610-5617.
- ⁴² Araujo, J.; González, E.; Egea, M.J.; García, M.L.; Souto, E.B. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **2009**, *5*, 394-401.
- ⁴³ Babazadeh, M. *Journal of Applied Polymer Science*, **2007**, *104*, 2403-2409.
- ⁴⁴ Babazadeh, M. *International Journal of Pharmaceutics*, **2008**, *356*, 167-173.
- ⁴⁵ Bédouet, L.; Moine, L.; Pascale, F.; Nguyen, V.N.; Labarre, D.; Laurent, A. *International Journal of Pharmaceutics*, **2014**, *459*, 51-61.
- ⁴⁶ Hasegawa, U.; van der Vlies, A.J.; Wandrey, C.; Hubbell, J.A. *Biomacromolecules*, **2013**, *14*, 3314-3320.
- ⁴⁷ García-Fernández, L.; Halstenberg, S.; Unger, R.E.; Aguilar, M.R.; Kirkpatrick, C.J.; San Román, J. *Biomaterials*, **2010**, *31*, 7863-7872.
- ⁴⁸ Parra-Ruiz, F.; Toledano, E.; Fernández-Gutiérrez, M.; Dinsjaski, N.; Prieto, M.A.; Vázquez-Lasa, B.; San Román, J. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2011**, *46*, 4980-4991.
- ⁴⁹ Rojo, L.; Barcenilla, J.M.; Vázquez, B.; González, R.; San Román, J. *Biomacromolecules*, **2008**, *9*, 2530-2535.
- ⁵⁰ Gallardo, A.; Rodríguez, G.; Fernández, M.; Aguilar, M.R.; San Román, J. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, **2004**, *15*, 917-928.

- ⁵¹ Lai, J.Y. *Materials Science and Engineering: C*, **2014**, *34*, 334-340.
- ⁵² Motheard, J.P.; Chatzopoulos, M.; Chappard, D. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, **1992**, *32*, 1-34.
- ⁵³ Wang, S.; Li, D.; Chen, H.; Wu, Z.; Xu, Y.; Brash, J.L. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, **2013**, *24*, 684-695.
- ⁵⁴ Hoffman, A.S. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2012**, *64*, 18-23.
- ⁵⁵ Koziol, A.; Martín-Alonso, M.; Clemente, C.; Gonzalo, P.; Arroyo, A.G. *European Journal of Cell Biology*, **2012**, *91*, 889-895.
- ⁵⁶ Murphy, G.; Nagase, H. *Molecular Aspects of Medicine*, **2008**, *29*, 290-308.
- ⁵⁷ Parks, W.C.; Wilson, C.L.; López-Boado, Y.S. *Nature Reviews Immunology*, **2004**, *4*, 617-629.
- ⁵⁸ Coussens, L.M.; Fingleton, B.; Matrisian, L.M. *Science*, **2002**, *295*, 2387-2392.
- ⁵⁹ Rodriguez, D.; Morrison, C.J.; Overall, C.M. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, **2010**, *1803*, 39-54.
- ⁶⁰ Vu, T.H.; Werb, Z. *Genes and Development*, **2000**, *14*, 2123-2133.
- ⁶¹ Nagase, H.; Woessner, J.F. *Journal of Biological Chemistry*, **1999**, *274*, 21491-21494.
- ⁶² Nagase, H.; Visse, R.; Murphy, G. *Cardiovascular Research*, **2006**, *69*, 562-573.
- ⁶³ Stamenkovic, I. *Journal of Pathology*, **2003**, *200*, 48-64.

- ⁶⁴ Sternlicht, M.D.; Werb, Z. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **2001**, *17*, 463-516.
- ⁶⁵ Gupta, S.P. *Chemical Reviews*, **2007**, *107*, 3042-3087.
- ⁶⁶ Zitka, O.; Kukacka, J.; Krizkov, S.; Huska, D.; Adam, V.; Masarik, M. Prusa, R.; Kizek, R. *Current Medicinal Chemistry*, **2010**, *17*, 3751-3768.
- ⁶⁷ Patil, V.; Sodji, Q.H.; Kornacki, J.R.; Mrksich, M.; Oyelere, A.K. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2013**, *56*, 3492-3506.
- ⁶⁸ Tegoni, M.; Dallavalle, F.; Santos, M.A. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2004**, *98*, 209-218.
- ⁶⁹ Tu, G.; Xu, W.; Huang, H.; Li, S. *Current Medicinal Chemistry*. **2008**, *15*, 1388-1395.
- ⁷⁰ Marques, S.M.; Tuccinardi, T.; Nuti, E.; Santamaria, S.; André, V.; Rosello, A.; Martinelli, A.; Santos, M.A. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2011**, *54*, 8289-8298.
- ⁷¹ Almansa, C.; González, C.; Torres, M.C. *Patente ES 2 172 690*, **1998**.
- ⁷² Nakayama, Y.; Masuda, T. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **2006**, *80B*, 260-267.

Capítulo 2

OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo consiste en el desarrollo de sistemas poliméricos portadores de ibuprofeno con capacidad antiinflamatoria. Para ello se preparan diferentes copolímeros con la característica común de comportarse como sistemas de liberación controlada de dicho fármaco, pero con unas propiedades composicionales y físico-químicas características que abre un amplio abanico de posibilidades de aplicación en el área de los biomateriales y como sistemas bioactivos con capacidad antiinflamatoria.

Así, los objetivos parciales del presente trabajo se describen a continuación:

- Optimización de la síntesis del monómero acrílico portador de ibuprofeno (HEI) a través de reacciones de esterificación no utilizadas en trabajos anteriores.
- Preparación y caracterización de fármacos poliméricos basados en copolímeros de gradiente anfífilos del monómero HEI y 1-vinilimidazol (VI). Estudio de las relaciones de reactividad de ambos monómeros e influencia en las características microestructurales de los sistemas obtenidos. Estudios *in vitro* de liberación de ibuprofeno y de citotoxicidad y adhesión celular.
- Preparación y caracterización de nanopartículas a partir de los copolímeros anfífilos p(HEI-co-VI) y evaluación de sus propiedades físico-químicas a nivel superficial e influencia del pH del medio. Estudios *in vitro* de liberación de ibuprofeno, ensayos de citotoxicidad y de capacidad antiinflamatoria así como de formación de complejos con zinc.

- Síntesis y caracterización de polímeros hidrófobos obtenidos a partir del monómero HEI y de otros monómeros de carácter hidrófobo, como el metacrilato de metilo (MMA) y acrilato de butilo (AB). Caracterización y determinación de las propiedades físico-químicas de los sistemas preparados y evaluación como posible recubrimiento de mallas coronarias (stents) con capacidad antiinflamatoria.

En el Anexo I de la presente memoria se puede encontrar una breve descripción de las principales técnicas de caracterización utilizadas.

Capítulo 3

MATERIALES Y MÉTODOS

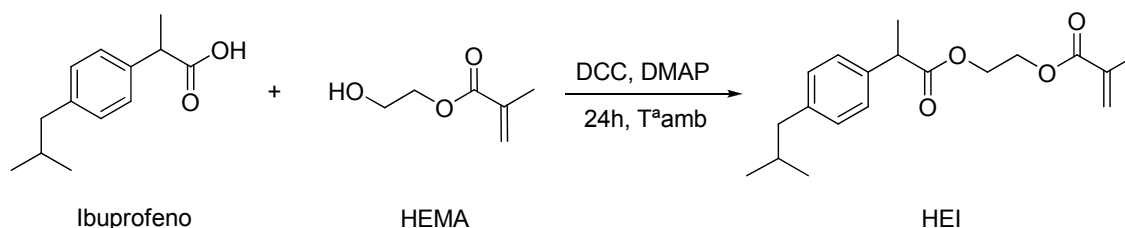
3.1 REACTIVOS

El ibuprofeno se ha recibido de la empresa LVD S.L. y utilizado sin previa purificación. El HEMA (Aldrich) se purifica siguiendo el protocolo descrito en la bibliografía.¹ 2,2'-azo-*bis*-isobutironitrilo (AIBN; Merck) se recrystaliza con metanol (p.f. 104 °C). Los tampones de pH 7 y 10 se preparan a partir de disoluciones concentradas (Tritisol; Merck) de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$ y de $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{KCl}/\text{NaOH}$ respectivamente. Para la diálisis se utilizan membranas de tamaño de poro de 3500 Daltons (Spectrum Lab.). Salvo que se indique lo contrario, el resto de reactivos y disolventes se usan en su forma comercial (grado síntesis) sin purificación previa.

3.2 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL MONÓMERO DERIVADO DE IBUPROFENO

3.2.1 Síntesis del monómero derivado de ibuprofeno: metacrilato de 2-({2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoil}oxi)etilo (HEI)

La preparación del monómero HEI se lleva a cabo mediante la reacción de esterificación de Steglich² mediada por carbodiimida entre el grupo ácido del fármaco y el grupo alcohol del HEMA (Esquema 3.1).



Esquema 3.1. Síntesis del derivado acrílico de ibuprofeno mediante reacción de esterificación de Steglich mediada por carbodiimida.

Para ello, se disuelven 20,0 g (97 mmol) de ibuprofeno en 200 ml de diclorometano. A continuación se añaden, bajo atmósfera de nitrógeno y con agitación constante, 10,7 ml (88 mmol) de HEMA previamente purificado, 100 mg (0,9 mmol) de 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) y por último 20,0 g (97 mmol) de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC). La mezcla se agita durante 24 horas y después se filtra la sal de *N,N'*-diciclohexilurea formada para eliminarla. La fase orgánica se lava con bicarbonato sódico al 5% (200 ml x 2) y con agua (200 ml x 2), se seca sobre sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El producto obtenido se vuelve a disolver en hexano (100 ml) y se lava con agua (100 ml x 2). La fase orgánica se seca sobre sulfato de magnesio anhidro y por último se elimina el disolvente a presión reducida obteniéndose así el monómero HEI.

3.2.2 Caracterización del monómero derivado de ibuprofeno (HEI)

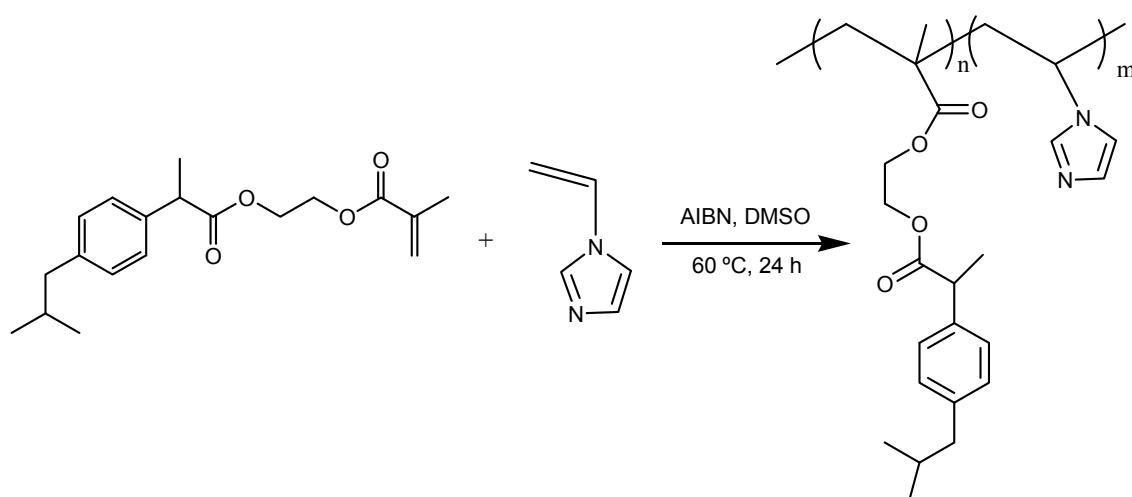
La estructura y pureza del monómero HEI se confirma mediante técnicas espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (^1H -RMN) y Carbono (^{13}C -RMN). Los espectros se registran en un equipo Varian 400 MHz. usando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3).

Se realiza también el estudio mediante Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier por Reflectancia Atenuada (ATR-FTIR). Para ello se deposita una capa delgada del monómero sobre el dispositivo de medida del equipo (Perkin-Elmer Spectrum One) y se registra el espectro.

3.3 SÍNTESIS DE SISTEMAS POLIMÉRICOS DERIVADOS DE IBUPROFENO

3.3.1 Síntesis de copolímeros de gradiente derivados de ibuprofeno y 1-vinilimidazol, p(HEI-co-VI)

Los copolímeros p(HEI-co-VI) se preparan por polimerización radical del monómero HEI y el VI (Esquema 3.2) a partir de composiciones en la alimentación HEI:VI (%molar) de 20:80, 50:50 y 80:20, y que se nombran como G37, G60 y G92 respectivamente.



Esquema 3.2. Síntesis de los copolímeros p(HEI-co-VI) mediante polimerización radical en disolución.

La reacción de copolimerización se realiza mediante disolución de los monómeros (0,25 M) en dimetilsulfóxido (DMSO) utilizando AIBN como iniciador de la polimerización radical (1,5x10⁻² M). Esta disolución se desoxigena mediante corriente de nitrógeno durante 15 minutos a temperatura ambiente y a continuación se mantiene a 60 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo la mezcla de reacción se purifica por diálisis en agua durante 5 días. Finalmente, el producto se aísla mediante liofilización hasta pesada constante.

3.3.2 Síntesis de copolímeros hidrófobos derivados de ibuprofeno

Se preparan varios copolímeros mediante reacción de polimerización radical del monómero HEI con acrilato de butilo (AB, Aldrich) y metacrilato de metilo (MMA, Aldrich), a partir de las composiciones en la alimentación descritas en la Tabla 3.1 y que se nombran como H1 a H5.

Copolímero	Alimentación		
	f(HEI)	f(AB)	f(MMA)
H1	100		
H2	60	40	
H3	70	30	
H4	50	10	40
H5	70	10	20

Tabla 3.1. Composición molar en alimentación (*f*) de los copolímeros hidrófobos preparados por polimerización radical.

La reacción de copolimerización se realiza mediante disolución de los monómeros (1 M) en *N,N*-dimetilformamida (DMF) utilizando AIBN como iniciador de la polimerización radicalica ($1,5 \times 10^{-2}$ M). Esta disolución se desoxigena mediante corriente de nitrógeno durante 15 minutos a temperatura ambiente y a continuación se mantiene a 60 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo la mezcla de reacción se purifica por precipitación en etanol y posterior secado a vacío del sólido formado hasta pesada constante.

3.4 CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS POLIMÉRICOS DERIVADOS DE IBUPROFENO

3.4.1 Caracterización mediante técnicas espectroscópicas

Todos los productos se caracterizan mediante ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, así como por ATR-FTIR. Los espectros se registran en equipos Varian 400 MHz. y Bruker AM 300 MHz. a 40 °C usando como disolvente CDCl_3 . La composición final a alta conversión de los copolímeros se determina mediante ^1H -RMN.

Para la obtención de los espectros de ATR-FTIR se deposita una muestra del material a analizar sobre la ventana del equipo (Perkin-Elmer Spectrum One) ejerciendo una presión controlada sobre éste para asegurar así un buen contacto ventana-muestra. La asignación de las bandas características se realiza de acuerdo con la bibliografía y con tablas de asignación teórica.

3.4.2 Técnicas cromatográficas

Mediante Cromatografía de Exclusión por Tamaños (SEC) se determinan los pesos moleculares promedio en número (M_n) y en peso (M_w) así como el índice de polidispersidad (IP, M_w/M_n) de los copolímeros utilizando un cromatógrafo Perkin-Elmer equipado con una bomba isocrática Serie 250 y un detector de índice de refracción Serie 200. Las muestras se eluyen a través de tres columnas conectadas en serie de poliestireno-divinilbenceno PL-gel de 500, 10^4 y 10^5 nm de tamaño de poro (Polymer Laboratories) a 70 °C. Como fase móvil se utiliza DMF con 0,1% de LiBr a un flujo de 0,3 ml/min. Para el calibrado se utilizan patrones monodispersos de polimetacrilato de metilo (PMMA) de peso molecular entre 2.500 y 480.000 Daltons.

3.4.3 Técnicas calorimétricas

Mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) se determina la temperatura de transición vítrea (T_g) de los copolímeros empleando un calorímetro (Perkin Elmer DSC8500) previamente calibrado con patrones de indio y zinc. Para ello, se depositan entre 5 y 10 mg de muestra seca de los distintos materiales en el interior de cápsulas de aluminio, se sellan y se calientan a velocidad constante de 10 °C/min con un flujo de N_2 de 20 ml/min en el intervalo de temperaturas de -30 a 190 °C. La T_g se toma como el punto medio de la transición de la capacidad calorífica observada en el termograma correspondiente al segundo barrido.³

3.4.4 Cálculo de las relaciones de reactividad de los monómeros HEI y VI. Caracterización microestructural de los sistemas p(HEI-co-VI)

Las relaciones de reactividad de los monómeros HEI y VI se calculan siguiendo la metodología descrita en la literatura^{4,5} y desarrollada por nuestro grupo de investigación mediante la monitorización *in situ* por ¹H-RMN de la reacción de copolimerización.

Las reacciones de copolimerización se llevan a cabo dentro del equipo de RMN (Varian 400 MHz.) usando como disolvente dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) a 60 °C. Para ello, en un tubo de resonancia se añaden todos los reactivos necesarios (monómeros, disolvente e iniciador), así como un tubo capilar con DMF en DMSO-d₆ (10 mg/ml) que se usa como señal de referencia (Figura 3.1). Con el fin de abarcar todo el intervalo de composiciones se estudian varias relaciones molares en la alimentación de HEI:VI, siendo la concentración total de monómeros 0,25 M.

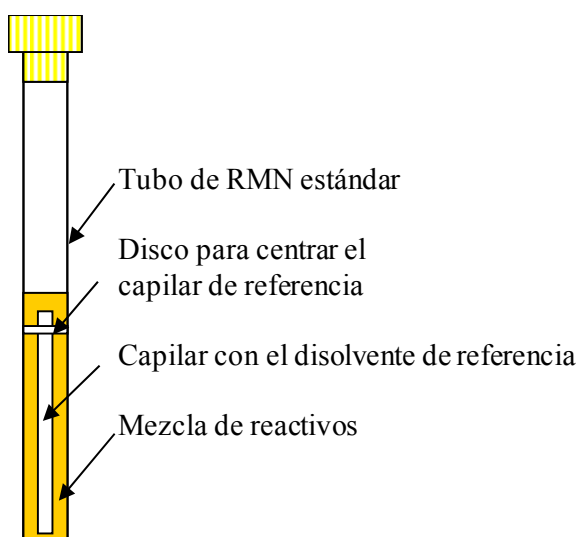


Figura 3.1. Dispositivo empleado para la monitorización de la reacción de polimerización mediante ¹H-RMN.

Para la obtención de los datos experimentales se utilizan los siguientes parámetros: pulso de 90°, adquisición de un espectro cada 120 segundos y velocidad de giro de 7 Hz.

Siguiendo la metodología descrita se obtienen una serie de espectros que se normalizan e integran usando un programa de análisis de datos (wxNUTS, Acorn NMR inc). Los valores de concentraciones instantáneas de los monómeros en la alimentación se calculan a partir de los espectros de ^1H -RMN y mediante las Ecuaciones 3.1 y 3.2:

$$[\text{HEI}] = H_{\text{HEI}}/H_{\text{DMF}} \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

$$[\text{VI}] = H_{\text{VI}}/H_{\text{DMF}} \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

donde H_{DMF} es el área de la señal asignada a los protones usados como referencia ($\delta = 2,9$ ppm) y $[\text{HEI}]$, $[\text{VI}]$, H_{HEI} y H_{VI} indican respectivamente las concentraciones instantáneas y el área asignada a los protones de los monómeros HEI y VI.

3.4.5 Recubrimiento de stents vasculares

Dada la posible aplicación de los copolímeros hidrófobos H1-H5 preparados en este trabajo como recubrimiento de stents vasculares se realiza el recubrimiento de dichos dispositivos para evaluar su comportamiento. Para ello se recubre el stent con una disolución del copolímero mediante tecnología de pulverización o “spray coating” y se deja secar durante 24 horas. A continuación se contrae el stent sobre balón y el catéter y se esteriliza el dispositivo mediante óxido de etileno quedando preparado para su aplicación clínica.

3.4.6 Comportamiento *in vitro* de los sistemas poliméricos derivados de ibuprofeno

3.4.6.1 Determinación del ángulo de contacto

Para la evaluación de la humectabilidad de los distintos copolímeros se realizan medidas del ángulo de contacto sobre la superficie de éstos mediante el método de gota en reposo (Sessile Drop) utilizando un goniómetro G10 (KRÜS). Para ello se utilizan líquidos de tensión superficial conocida como agua ($\gamma_l = 72,8 \text{ mN/m}$), glicerina ($\gamma_l = 63,4 \text{ mN/m}$) y diiodometano ($\gamma_l = 50,8 \text{ mN/m}$). La cantidad de líquido depositada en la superficie es de 5 μl midiendo el ángulo de contacto entre las superficies y los diferentes líquidos al menos en 10 zonas de las mismas y calculando posteriormente el valor promedio.

3.4.6.2 Liberación *in vitro* de ibuprofeno

Los estudios de liberación *in vitro* de ibuprofeno se llevan a cabo por triplicado en disoluciones tamponadas a pH 7 y 10. Para ello, pastillas de aproximadamente 100 mg de los copolímeros de gradiente y del copolímero hidrófobo denominado H5 se sumergen en 10 ml de la disolución tampón y se mantienen a 37 °C. A lo largo del tiempo se toman alícuotas de 3 ml, reponiendo el mismo volumen con disolución tampón fresca.

La cantidad de ibuprofeno liberado a diferentes tiempos se determina por espectroscopía ultravioleta (UV) (Perking Elmer Lambda 16) ($\lambda = 263 \text{ nm}$, máximo de absorción del ibuprofeno) mediante interpolación de la medida en una recta de calibrado de concentración conocida de ibuprofeno entre 0,2 y 10^{-4} mg/ml ($R^2 > 0,99$).

3.4.7 Estudios de biocompatibilidad *in vitro* de los sistemas poliméricos derivados de ibuprofeno

Los ensayos celulares *in vitro* se aplican a los copolímeros de gradiente (G37, G60 y G92) así como al copolímero hidrófobo p(HEI-co-AB-co-MMA) 70:10:20 (H5).

Los ensayos MTT y Alamar Blue se llevan a cabo empleando discos de Thermanox® (TMX) recubiertos con una disolución al 5% en dioxano de cada sistema polimérico en estudio (muestras por triplicado). Se utilizan también discos TMX sin recubrir como control negativo no citotóxico y una disolución al 1% de Tritón-X100 (Merck) en medio de cultivo como control positivo. Como línea celular se emplea un cultivo primario de células endoteliales humanas obtenidas a partir de vena umbilical (HUVECS, Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Pharmakine DPK-HUVEC) y también fibroblastos de piel humana de adulto (FBH, Pharmakine DPK-SKDF-HS) para los estudios de biocompatibilidad del copolímero H5. Los cultivos se mantienen y multiplican a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂. Como medio de cultivo se emplea medio M-199 modificado con HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico; Sigma), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SBF; Gibco), 1% de una disolución de penicilina-estreptomicina (10000 U/ml penicilina y 10 mg/ml estreptomicina; Sigma), 0,1% de factor de crecimiento endotelial (Sigma) y 0,1% de heparina sódica (Sigma).

3.4.7.1 Evaluación de citotoxicidad. Ensayo MTT

El ensayo se realiza sumergiendo los respectivos materiales, previamente esterilizados mediante radiación UV, en 5 ml de medio de cultivo (sin SBF) a 37 °C y en agitación durante 1, 2 y 7 días, tras los cuales

se extrae dicho medio para su uso posterior, siendo sustituido en cada caso por medio fresco. Una vez extraídos cada uno de los eluyentes se prepara un concentrado de células en medio fresco completo a una concentración de 10^5 células/ml y se realiza con él la siembra sobre placas de 96 pocillos. Para ello se adicionan 100 μ l del concentrado de células en cada uno de los pocillos y se cultivan a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5%. Transcurridas 24 horas de la siembra se intercambia el medio de cultivo por los eluyentes previamente extraídos, incluyendo también el control positivo. Todas las placas se incuban durante 24 horas en las mismas condiciones. Posteriormente, se retiran los eluyentes y se adiciona la disolución del reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) en medio fresco al 10%, la cual ha sido preparada a partir de otra disolución previa en tampón fosfato (PBS) de concentración 5 mg/ml. Se incluye también un blanco (sólo el reactivo MTT) y las placas se mantienen de nuevo a 37 °C durante 4 horas más. Tras este tiempo se retira el contenido de los pocillos y se añade en cada uno de ellos 100 μ l de DMSO para disolver los cristales formados. A continuación se realiza la lectura de densidad óptica a 570 nm en un lector de placas Biotek ELX808IU. La viabilidad celular relativa (VC) se calcula a partir de la Ecuación 3.3:

$$VC = 100 \times (OD_M - OD_B) / (OD_C - OD_B) \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

donde OD_M, OD_B y OD_C son la densidad óptica para la muestra, el blanco y el control respectivamente.

Los resultados se normalizan respecto al control negativo (TMX = 100 %) y se realizan test estadísticos de ANOVA.

3.4.7.2 Evaluación de la adhesión y proliferación celular. Ensayo Alamar Blue

Tres réplicas de cada material y del control negativo se colocan en una placa de 24 pocillos y se siembra 1 ml de concentrado de células (10^5 células/ml) por pocillo en medio completo. Estas placas se incuban a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 21 días. Durante esta incubación se realizan 5 lecturas de densidad óptica a 1, 4, 7, 14 y 21 días. Para la realización de las medidas se retira de cada pocillo el medio de cultivo y se adiciona 1 ml de una disolución al 10% del reactivo Alamar BlueTM (Serotec)⁶ en medio M-199 sin el indicador de pH rojo fenol (ya que éste interfiere con el reactivo Alamar BlueTM), incluyendo también un blanco. Tras esta adición se incuba la placa durante 4 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo, el contenido de cada pocillo se retira para su análisis y se adiciona de nuevo medio completo a las placas para mantener el cultivo en perfectas condiciones y hacer posteriores medidas a tiempos más largos. La fluorescencia creada se mide en un lector de placas Biotek ELX808IU empleando una longitud de onda de excitación de 510 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. La evolución temporal de la proliferación celular se lleva a cabo a partir de las medidas realizadas a distintos periodos de tiempo contrastando las diferencias existentes con respecto al control negativo TMX mediante un test de significancia ANOVA.

3.4.7.3 Morfología celular, proliferación y adhesión celular por microscopía electrónica de barrido ambiental

En el caso del copolímero hidrófobo H5 preparado en este trabajo se estudia la morfología celular y proliferación celular sobre una superficie recubierta con este material.

Para ello se siembra por duplicado un concentrado de células (HUVECS y FBH) en medio completo (10^5 células/ml) directamente sobre superficies recubiertas con el copolímero H5 así como sobre el control negativo TMX. Las muestras se mantienen en incubación a 37 °C y bajo atmósfera de CO₂ al 5%. Tras 24 horas y tras 7 días se fijan las muestras para estudiarlas bajo Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). El protocolo de fijación aplicado consiste en lavar las muestras con una disolución acuosa de glutaraldehído al 2,5% (Fluka) que se mantiene en contacto con las muestras 24 horas protegidas de la luz y a temperatura ambiente. Para la observación de las muestras al microscopio (Philips XL 30 ESEM) se secan a 37 °C y se metalizan con oro (Sputter coater POLARON SC 7640).

3.5. OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS BIOACTIVAS A PARTIR DE COPOLÍMEROS DE GRADIENTE DERIVADOS DE IBUPROFENO Y 1-VINILIMIDAZOL

3.5.1 Preparación de nanopartículas

Para la preparación de nanopartículas poliméricas se aplica el método de nanoprecipitación.⁷⁻¹⁰ Para ello se preparan disoluciones de 10 mg/ml usando como disolvente acetona para las composiciones G60 y G92 y etanol para la composición G37. A continuación se añade gota a gota la correspondiente disolución sobre agua destilada bajo agitación vigorosa. Con el objetivo de estudiar la influencia de la concentración final de nanopartículas en el tamaño de las mismas, se preparan dispersiones a

diferentes concentraciones (0,05-1 mg/ml) variando los volúmenes de la fase orgánica y acuosa. Al terminar la adición se mantiene la agitación durante 2-3 días para evaporar el disolvente orgánico utilizado. Las nanopartículas preparadas se nombran como NP37, NP60 y NP92 según el copolímero a partir del cual han sido preparadas.

3.5.2 Caracterización de nanopartículas bioactivas. Comportamiento *in vitro*

3.5.2.1 Determinación de la constante de ionización (pK)

La constante de ionización (pK) de los sistemas nanoparticulados preparados en este trabajo se calcula mediante valoración ácido-base. Para ello, según el procedimiento descrito en el apartado 3.5.1, se preparan dispersiones de nanopartículas de 0,5 mg/ml. Con HCl (0,1 M) se baja el pH de la dispersión hasta un valor de 3 y se ajusta la fuerza iónica del medio con NaCl (0,1 M), registrándose el pH alcanzado tras adiciones de volúmenes de 20 µl de NaOH (0,1 M). El punto de equivalencia (pE) se obtiene del máximo en la primera derivada de la curva de valoración, con el cual es posible calcular el pK mediante la Ecuación 3.4,

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{V_{\text{NaOH}}}{V_{\text{PE}} - V_{\text{NaOH}}} \quad (\text{Ecuación 3.4})$$

donde V_{NaOH} y V_{PE} son el volumen de disolución valorante de NaOH añadido en cada punto y el volumen de disolución de NaOH consumido en el punto de equivalencia respectivamente. Por tanto, la representación gráfica de los valores de pH frente al $\log (V_{\text{NaOH}} / V_{\text{PE}} - V_{\text{NaOH}})$ será una recta de pendiente unidad cuya ordenada en el origen coincide con el valor del pK del sistema en estudio.

3.5.2.2 Propiedades hidrodinámicas superficiales: distribución de tamaño de partícula y potencial zeta. Influencia del pH

Con el objetivo de comprobar y estudiar la formación de nanopartículas a partir de los copolímeros p(HEI-co-VI) se realizan medidas de tamaño de partícula y potencial zeta usando un equipo Zetasizer (Nano ZS, Malvern Instruments) equipado con un láser rojo a 633 nm (He/Ne). Para la realización de medidas, las nanopartículas preparadas según el procedimiento descrito en el apartado 3.5.1 se introducen en cubetas DTS 1061 (Malvern Instruments) de forma cuidadosa para evitar la formación de burbujas. Esta cubeta se introduce en el Zetasizer y se realizan medidas por triplicado, manteniendo la temperatura a 25 °C durante las medidas. El tamaño de partícula se determina mediante medidas de Dispersión de Luz Dinámica (DLS). El potencial zeta se calcula a partir de medidas de movilidad electroforética.

Para estudiar la influencia del pH en el tamaño y potencial zeta de las nanopartículas, se preparan dispersiones de 0,5 mg/ml según el procedimiento descrito en el apartado 3.5.1. Con HCl (0,1 M) se baja el pH de la dispersión hasta un valor de 3 y se ajusta la fuerza iónica del medio con NaCl (0,1 M). Se van realizando medidas de tamaño y potencial zeta según va aumentando el pH en unidades de uno al ir adicionando NaOH (0,1 M).

3.5.2.3 Examen morfológico y de tamaño mediante microscopía electrónica (SEM y TEM)

La morfología y el tamaño de las nanopartículas se observa mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y de Transmisión (TEM). Según la técnica empleada, la preparación de muestras es la siguiente:

- Para los estudios mediante SEM (Hitachi SU 8000), se deposita sobre un disco de vidrio una pequeña cantidad de la dispersión de nanopartículas preparadas (0,1 mg/ml), se deja secar y se metaliza con oro/paladio (Sputter coater POLARON SC 7640).
- Para los estudios de TEM (Hitachi SU 8000) 5 μ l de la dispersión de nanopartículas (0,1 mg/ml) se colocan sobre una rejilla de cobre (100 mesh) recubierta con una película de polivinil formal (Sigma). Una vez seca, se depositan 5 μ l de una disolución al 2% de acetato de uranilo (Fluka) para teñir las nanopartículas, después de 2 minutos se retira el exceso y se deja secar.

3.5.2.4 Estudio de capacidad quelante de iones Zn^{2+}

Para estudiar la formación de complejos entre las nanopartículas descritas en este trabajo con Zn^{2+} , se preparan en primer lugar disoluciones acuosas de ZnCl_2 a una concentración tal que la relación molar final VI: Zn sea 6:1, para lo cual se tiene en cuenta la cantidad de VI presente en cada sistema nanoparticulado. A continuación, se prepara la dispersión de nanopartículas (0,5 mg/ml) sobre 25 ml de la disolución de Zn^{2+} y seguidamente se ajusta el pH entre 3 y 7 con HCl o NaOH para poder estudiar el efecto del pH en la cantidad de Zn^{2+} complejoado. Esta dispersión se agita durante 2 días, tras los cuales se separa el sobrenadante de las nanopartículas mediante 2 ciclos de centrifugación a 12000 r.p.m. Durante 2 - 3 días se deja evaporar el etanol o acetona utilizado a la hora de preparar las nanopartículas, tras los cuales se enrasa el volumen a 25 ml con agua Milli-Q. Mediante medidas con un espectrómetro de emisión atómica por plasma ICP (Perkin-Elmer 4300 DV) se determina la concentración de Zn^{2+} en el sobrenadante (que no ha complejoado con el VI) así como de las disoluciones originales de Zn^{2+} de partida.

3.5.2.5 Liberación de ibuprofeno

El estudio de liberación de ibuprofeno a partir de las nanopartículas se realiza en medios de liberación tamponados a pH 7 y 10 suplementados con 0,5 % de poli(alcohol vinílico) (PVA). Para ello, se preparan dispersiones de 0,5 mg/ml en 5 ml de los diferentes medios de liberación que se introducen en membranas de diálisis de tamaño de poro de 3500 daltons (Spectrum Lab.), la cual se sumerge en 20 ml del correspondiente medio de liberación. Las muestras se mantienen a 37 °C sobre un agitador orbitálico y cada cierto tiempo se toman alícuotas de 2 ml, reponiendo el mismo volumen con medio de liberación fresco.

La cantidad de ibuprofeno liberado se determina mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) usando un cromatógrafo Shimadzu (SIL 20A) equipado con una columna Phenomenex Bondclone (10µm C-18, 300x3,9 mm) y con un detector UV ($\lambda = 263$ nm, máximo de absorción del ibuprofeno) y mediante interpolación de la medida en una recta de calibrado de concentración conocida de ibuprofeno entre 0,5 y 10^{-4} mg/ml ($R^2 > 0,99$). Como fase móvil se utiliza una mezcla 1:1 de acetonitrilo y tampón fosfato (0,01 M; pH 3) y una velocidad de flujo de 1 ml/min.

3.5.2.6 Estudios de biocompatibilidad *in vitro*

3.5.2.6.1 Determinación de la concentración inhibitoria del 50% (IC₅₀)

Para determinar la IC₅₀ de cada sistema nanoparticulado se prepara según el procedimiento descrito en los apartados anteriores una dispersión de nanopartículas de 0,5 mg/ml en agua. Tras el periodo de evaporación del disolvente orgánico, se esteriliza la muestra mediante radiación UV. A partir de esta dispersión se preparan diluciones sucesivas (desde 0,5 mg/ml a $2,4 \times 10^{-4}$ mg/ml) empleando agua destilada previamente esterilizada.

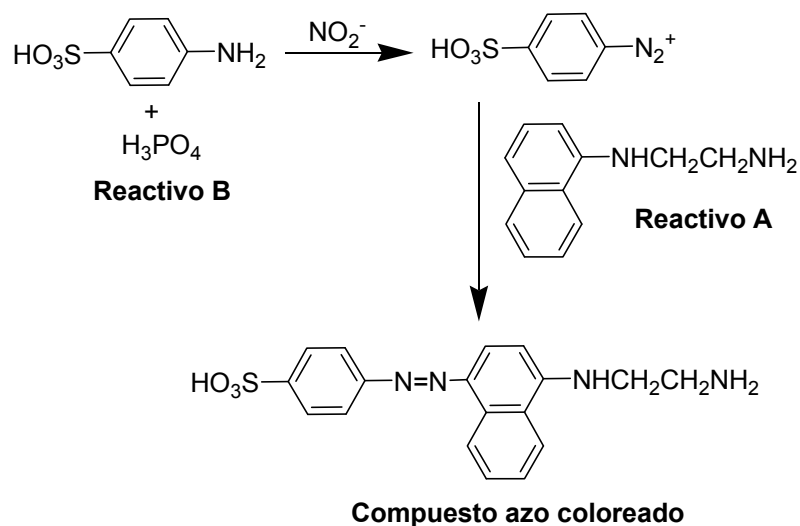
Este ensayo consiste en la realización del ensayo MTT ya descrito en el apartado 3.4.7.1 para así determinar la viabilidad celular para cada concentración de nanopartículas. Se emplean células endoteliales (HUVECS) y se sigue la metodología de cultivo previamente descrita. En este caso, trascurridas 24 horas desde la siembra de células, se retira el medio y se añaden 100 µl de medio de cultivo sin SBF junto con 50 µl de cada una de las diluciones de nanopartículas preparadas y las placas se incuban durante 24, 48 y 72 horas. Después de cada uno de los tiempos de estudio se continúa con el procedimiento descrito en el apartado 3.4.7.1, obteniendo los datos de viabilidad celular relativa (VC) para cada una de las diluciones de nanopartículas a los diferentes tiempos de estudio. Los resultados se normalizan respecto al control negativo (100 µl de medio de cultivo sin SBF y 50 µl de agua) y se realizan test estadísticos de ANOVA.

3.5.2.6.2 Evaluación de la capacidad antiinflamatoria

Para el estudio de la capacidad antiinflamatoria de las nanopartículas preparadas en este trabajo se aplica el ensayo inhibición de óxido nítrico (NO) según el método descrito en la bibliografía.¹¹ Como línea celular se

emplean macrófagos RAW 264.7 (ECACC, Sigma) que se mantienen y multiplican a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂. Como medio de cultivo se emplea medio Eagle modificado con 110 mg/ml de piruvato sódico (DMEM, Sigma), suplementado con un 10% de SBF, 1% de una disolución de penicilina-estreptomicina (10000 U/ml penicilina y 10 mg/ml estreptomicina) y 2% de L-glutamina.

Sobre placas de 96 pocillos se realiza la siembra de 100 µl de un concentrado de células RAW de 5x10⁴ células/ml, que se cultivan a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5%. Transcurridas 24 horas de la siembra las células fueron estimuladas durante 30 minutos con 1 µg/ml de lipopolisacárido (LPS; *Escherichia coli* 0127:138, Sigma Aldrich), ya que actúa como control positivo de inflamación. A continuación se añaden al medio 50 µl de las diluciones de nanopartículas de cada composición a concentraciones tales que, después de haber realizado el ensayo anterior, conocemos que presentan valores de viabilidad celular superiores al 70%. Se mantiene el cultivo durante 24 horas tras las cuales se determina la concentración de nitrito mediante la reacción de Griess.¹² Para llevar a cabo tal reacción (Esquema 3.3), se toman 150 µl del sobrenadante del cultivo celular que se colocan en placas de 96 pocillos y se agregan 20 µl del reactivo de Griess y 130 µl de agua destilada. El reactivo de Griess consiste en una mezcla 1:1 de 0,1% de *N*-1-(naftil)-etilendiamina en agua (Reactivo A) y 1% de sulfanilamida en 5% de ácido fosfórico (Reactivo B). Las placas se mantienen a temperatura ambiente durante 30 minutos tras los cuales se realiza la medida de absorbancia a 548 nm en un lector de placas Biotek ELX808IU.



Esquema 3.3. *Reacción de Griess para la cuantificación de nitritos por la formación de un colorante tipo azo.*

La cantidad de nitrito en el medio de cultivo se determina mediante interpolación de la medida en una recta de calibrado de concentración conocida de NaNO_2 ($R^2 > 0,99$), y los resultados se expresan como porcentaje de reducción de NO.

Paralelamente, una vez extraído el contenido de los pocillos, se realiza el ensayo MTT para corroborar la alta viabilidad de las células siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.4.7.1.

3.6. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Fort, R.J.; Polyzoidis, T.M. *European Polymer Journal*, **1976**, *12*, 685-689.
- ² Neises, B.; Steglich, W. *Angewandte Chemie International Edition*, **1978**, *17*, 522-524.
- ³ Turi, E.A. *Thermal Characterization of Polymeric Materials*. Academia Press. **1985**. Londres.
- ⁴ Aguilar, M.R.; Gallardo, A.; Fernández, M.D.; San Román, J. *Macromolecules*, **2002**, *35*, 2036-2041.
- ⁵ García-Fernández, L.; Aguilar, M.R.; Fernández, M.M.; Lozano, R.M.; Giménez, G.; San Román, J. *Biomacromolecules*, **2010**, *11*, 626-634.
- ⁶ Nakayama, G.R.; Caton, M.C.; Nova, M.P.; Parandoosh, Z. *Journal of Immunological Methods*, **1997**, *204*, 205-208.
- ⁷ Feesi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.Ph.; Ammourey, N.; Benita, S. *International Journal of Pharmaceutics*, **1989**, *55*, R1-R4.
- ⁸ Çirpanli, Y.; Bilensoy, E.; Dogan, A.L.; Çalis, S. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2009**, *73*, 82-89.
- ⁹ Ren, W.H.; Chang, J.; Yan, C.H.; Qian, X.M.; Long, L.X.; He, B.; Yuan, X.B.; Kang, C.S.; Betbeder, D.; Sheng, J.; Pu, P.Y. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **2010**, *21*, 2673-2681.
- ¹⁰ Michailova, V.; Berlinova, I.; Iliev, P.; Ivanov, L.; Titeva, S.; Momekov, G.; Dimitrov, I. *International Journal of Pharmaceutics*, **2010**, *384*, 154-164.
- ¹¹ Wang, S.Y.; Lan, X.Y.; Xiao, J.H.; Yang, J.C.; Kao, Y.T.; Chang, S.T. *Phytotherapy Research*, **2008**, *22*, 213-216.

¹² Schmidt, H.H.H.W.; Kelm, M. *Methods in Nitric Oxide Research*, **1996**, 491-497.

Capítulo 4

COPOLÍMEROS DE GRADIENTE DERIVADOS DE IBUPROFENO Y 1-VINILIMIDAZOL

4.1 INTRODUCCIÓN

4.1.1 Conceptos generales de copolimerización radical

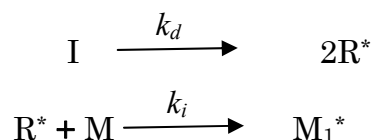
Dentro de los distintos métodos de copolimerización, la copolimerización radical constituye una técnica muy versátil que nos brinda la oportunidad de obtener materiales con propiedades preestablecidas debido a las amplias posibilidades que han abierto los conocimientos logrados sobre polimerización y la relación estructura-propiedades. La combinación de monómeros existentes y de nueva síntesis, la variación de la relación molar de éstos en el medio de reacción, la disposición de las diferentes unidades (al azar, en bloque, de gradiente, etc.) y los diferentes métodos de procesado, nos conducen a un número ilimitado de materiales que difieren tanto en composición química como en propiedades físicas. Así, las propiedades fisicoquímicas y el comportamiento biológico de los sistemas poliméricos dependen tanto de los monómeros que los componen como de las características microestructurales de las cadenas sintetizadas durante el proceso de polimerización.¹

Las reacciones de polimerización vía radicalica transcurren en tres etapas llamadas de iniciación, propagación y terminación (Esquema 4.1).² La etapa de propagación es la que determina la composición del copolímero como consecuencia de la distinta reactividad de los monómeros al adicionarse a la cadena polimérica.

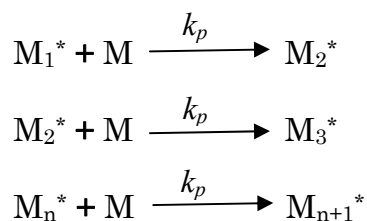
Según el Esquema 4.1 la etapa de iniciación comprende dos reacciones. En la primera de ellas tiene lugar la formación de radicales libres mediante la disociación homolítica de un iniciador (I) en la que k_d es la constante de descomposición catalítica del iniciador. Esta etapa se puede producir por vía fotoquímica, térmica o por descomposición, siendo las dos primeras vías las más utilizadas. En la segunda reacción se produce la adición del radical

formado (R^*) a la primera molécula de monómero, formándose la especie radical activa, y donde k_i es la constante cinética de esta etapa.

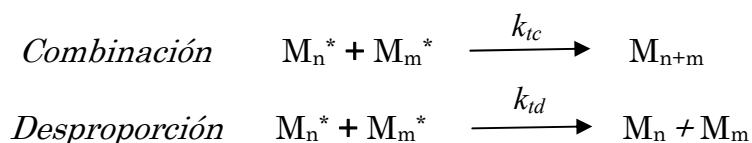
Iniciación



Propagación



Terminación



Esquema 4.1. Mecanismo general de polimerización radical para polímeros vinílicos.

La etapa de propagación consiste en el ataque de la especie radical activa al doble enlace del monómero, incorporando con cada ataque una unidad nueva y formando en cada reacción un nuevo macrorradical (M_2^*), que continúa el proceso de adición de sucesivas moléculas de monómero (M_{n+1}^*) siendo k_p la constante de velocidad de propagación.

La etapa de terminación consiste en una reacción bimolecular entre radicales que da lugar a un enlace covalente. Esta reacción de terminación puede tener lugar por combinación, cuando se forma una sola molécula de polímero, o por desproporción, donde un hidrógeno en posición β respecto a

un centro activo, se trasfiere al extremo reactivo de otro macrorradical dando lugar a dos moléculas de polímero.

Considerando que la descomposición térmica del iniciador sigue una cinética de primer orden y asumiendo la irreversibilidad de las reacciones, la ausencia de reacciones secundarias, que la constante de propagación es independiente del tamaño del radical y aceptando la aproximación del estado estacionario, se obtiene la siguiente ecuación como expresión general de la velocidad global de polimerización,

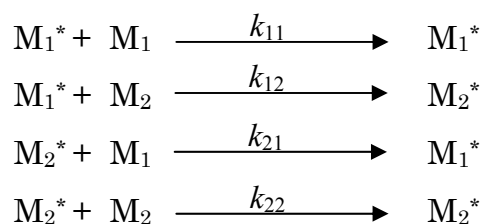
$$R_p = \frac{k_p}{k_t^{1/2}} (M) [2fk_d(I)^{1/2}] \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

donde (M) y (I) son las concentraciones de monómero e iniciador respectivamente y f es el factor de eficacia del iniciador, definido como la fracción de radicales producidos que da lugar a la iniciación de las cadenas poliméricas.

4.1.2 Relaciones de reactividad. Análisis por ^1H -RMN *in situ*

Modelo terminal de polimerización.

El modelo terminal de copolimerización propuesto por Mayo y Lewis³ asume que la reactividad de la especie en propagación depende únicamente de la unidad final que porta el centro activo y no de la composición de la cadena que le precede. Considerando el caso de dos monómeros M_1 y M_2 , los dos tipos de especies en propagación serán M_1^* y M_2^* . Las posibles reacciones de propagación serán:



donde k_{11} , k_{12} , k_{21} y k_{22} son las constantes cinéticas de cada una de las reacciones de propagación. Se asume que el estado estacionario se alcanza rápidamente y la concentración de radicales permanece constante durante toda la reacción, lo que supone que la velocidad a la que los radicales M_1^* se convierten en M_2^* es igual a la velocidad a la que M_2^* se convierte en M_1^* , y por lo tanto el número de radicales que se forman es igual al número de radicales que se consumen.

En este tipo de proceso la velocidad de consumo de cada uno de los monómeros viene dada por las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \frac{-d(M_1)}{dt} &= k_{11} (M_1^*) (M_1) + k_{21} (M_2^*) (M_1) \\ \frac{-d(M_2)}{dt} &= k_{12} (M_1^*) (M_2) + k_{22} (M_2^*) (M_2) \end{aligned} \quad (\text{Ecuaciones 4.2 y 4.3})$$

Si dividimos ambas ecuaciones y tenemos en cuenta la aproximación del estado estacionario (el número de centros activos permanece constante), es decir:

$$k_{12} (M_1^*) (M_2) = k_{21} (M_2^*) (M_1)$$

llegamos a la ecuación de composición del copolímero o ecuación de copolimerización,

$$\frac{d(M_1)}{d(M_2)} = \frac{(M_1)}{(M_2)} \cdot \frac{r_1 (M_1) + (M_2)}{r_2 (M_2) + (M_1)} \quad (\text{Ecuación 4.4})$$

que expresa la composición instantánea del copolímero en función de las relaciones de reactividad (r_1 y r_2) y de la concentración de monómeros en la alimentación. Las relaciones de reactividad expresan la reactividad relativa de cada tipo radical con su propio monómero respecto al otro, y sus valores vienen dados por las expresiones:

$$\begin{aligned} r_1 &= \frac{k_{11}}{k_{12}} \\ r_2 &= \frac{k_{22}}{k_{21}} \end{aligned} \quad (\text{Ecuaciones 4.5 y 4.6})$$

La ecuación de copolimerización (Ecuación 4.4) puede expresarse también en función de fracciones molares, ya que la relación $d(M_1)/d(M_2)$ corresponde a la fracción molar instantánea en el copolímero (F_1/F_2).

$$\frac{F_1}{F_2} = \frac{f_1 (r_1 \cdot f_1 + f_2)}{f_2 (r_2 \cdot f_2 + f_1)} \quad (\text{Ecuación 4.7})$$

donde F y f representan las fracciones molares instantáneas en el copolímero y en la alimentación respectivamente ($F_1 + F_2 = 1$ y $f_1 + f_2 = 1$).

Ecuación integrada.

Las propiedades físico-químicas y el comportamiento de los sistemas poliméricos dependen de las características microestructurales de las cadenas sintetizadas durante el proceso de polimerización. Las relaciones de reactividad son dos de los parámetros cinéticos más característicos y nos proporcionan información acerca de la composición media y de la distribución estadística de secuencias de monómeros (microestructura) a lo largo de la cadena macromolecular.^{4,5}

Los métodos más utilizados para la estimación de r_1 y r_2 emplean la ecuación diferencial de copolimerización (Ecuaciones 4.4 y 4.7). El protocolo consiste en la preparación de copolímeros a baja conversión cubriendo todo el rango de composiciones molares del sistema, de 0 a 1, y la posterior determinación de la composición mediante, por ejemplo, técnicas espectroscópicas.

El ajuste de los datos experimentales a la ecuación diferencial de composición se suele realizar a partir de parejas de valores f_i/F_i calculados experimentalmente utilizando procedimientos de linealización, como los métodos de Fineman-Ross⁶ y Kelen-Tüdös⁷ o mediante el ajuste no lineal de los resultados, como los algoritmos de Tidwell y Mortimer.⁸ Estos métodos nos dan valores aproximados de las relaciones de reactividad, siendo los algoritmos no lineales propuestos por Behnken⁹ la aproximación más correcta a la hora de estimar dichos parámetros.

Los métodos estándares anteriormente comentados implican la preparación, aislamiento y purificación de copolímeros a baja conversión en todo el intervalo de composiciones molares, un protocolo tedioso y que arrastra un gran número de errores experimentales y problemas intrínsecos debido a la pérdida de material, presencia de monómero residual o disolventes y fraccionamiento de la muestra, entre otros. Estos errores son especialmente acusados en el caso de parejas con relaciones de reactividad muy diferentes, donde la composición del copolímero dista mucho de la composición en la alimentación. Además, los copolímeros obtenidos no corresponden a los formados instantáneamente con la composición inicial en alimentación, sino que se trata del promedio de copolímeros formados hasta que la copolimerización se detiene a baja conversión. Como alternativa a estos métodos es preferible determinar los valores de r_1 y r_2 haciendo uso de la forma integrada de la ecuación diferencial de composición (Ecuación 4.8). La utilización de esta ecuación no conlleva las anteriores limitaciones y puede ser utilizada para conversiones mayores del 15-20% ya que tiene en cuenta la variación de composición.^{10,11}

$$\frac{(M_2)}{(M_2)_0} = \left(\frac{(M_2)_0 (M_1)}{(M_1)_0 (M_2)} \right)^{\frac{r_2}{1-r_2}} \left(\frac{(r_1-1)((M_1)/(M_2)-r_2+1)}{(r_1-1)((M_1)_0/(M_2)_0-r_2+1)} \right)^{\frac{r_1 r_2 - 1}{(1-r_1)(1-r_2)}}$$

(Ecuación 4.8)

En este caso la estimación de las relaciones de reactividad se puede realizar mediante métodos lineales, como los propuestos por Mao y Huglin,^{12,13} que requieren de técnicas que permitan el cálculo de la composición del copolímero durante la reacción, la cual puede determinarse de dos formas: indirectamente, midiendo la concentración de los monómeros que no han reaccionado y haciendo balances de materia para calcular la fracción molar de monómeros en el copolímero acumulado; o bien directamente, midiendo la composición del copolímero formado. En cualquiera de los dos casos es necesaria la separación de monómeros y copolímero, ya que ambos poseen prácticamente los mismos grupos funcionales, introduciendo nuevamente de este modo un factor de error y de dificultad añadidos para el cálculo exacto de las relaciones de reactividad.

En el presente trabajo las relaciones de reactividad se calculan siguiendo una metodología bien establecida basada en la monitorización *in situ* de la reacción de copolimerización mediante RMN que no necesita la manipulación de la muestra ni el aislamiento del copolímero, sino que nos permite obtener datos instantáneos de composición en el copolímero a partir del consumo de los monómeros por análisis cuantitativo de ¹H-RMN.¹⁴ El método emplea la solución integrada exacta de la ecuación diferencial de copolimerización definida para el modelo terminal para ajustar directamente la evolución de las concentraciones de monómeros obtenidas.

Así, se puede relacionar la variación de la concentración de monómeros con las relaciones de reactividad utilizando la solución integrada exacta de

la ecuación de copolimerización que describe el modelo terminal³ (Ecuación 4.9),

$$y = y_0 \left(\frac{x}{x_0} \right)^{b/(1-b)} \left(\frac{1-b+(a-1)x}{1-b+(a-1)x_0} \right)^{ab-1/(1-a)(1-b)}$$

(Ecuación 4.9)

siendo $y = (M_2)$, $x = (M_1) / (M_2)$, $a = r_1$ y $b = r_2$.

Los valores óptimos de las relaciones de reactividad se obtienen mediante el ajuste no lineal por mínimos cuadrados de los datos experimentales a la Ecuación 4.9. Tomando distintos valores de x_0 e y_0 para considerar distintos puntos experimentales como condiciones iniciales de la reacción, se obtienen, para cada uno de los ajustes, los correspondientes valores de relaciones de reactividad (r_1 y r_2). El error experimental asociado a cada x_0 e y_0 hace que los valores de r_1 y r_2 se desplacen a lo largo de una línea recta para cada serie de datos obtenida con cada una de las reacciones. Esto se debe a que las relaciones de reactividad que se ajustan a cada grupo de puntos experimentales están altamente relacionadas. Al representar el conjunto de valores obtenidos r_1 - r_2 para las reacciones llevadas a cabo con las distintas composiciones de partida, se obtiene un punto de corte que corresponde al valor de las relaciones de reactividad verdadero, independientemente del error introducido por x_0 e y_0 .

La gran diferencia entre este método y el descrito por Mayo-Lewis para polímeros sintetizados a alta conversión, es que éstos últimos determinan r_1 y r_2 mediante iteraciones con un solo dato de composición inicial y final. Sin embargo, mediante este método, r_1 y r_2 se obtienen de la monitorización de las reacciones de copolimerización con multitud de datos de composición. Es decir, el método de Mayo-Lewis utiliza datos de composición puntuales y

este método obtiene datos de composición instantánea en todo el rango de conversiones monitorizadas.

4.1.3 Arquitectura molecular. Copolímeros de gradiente

Conocer los valores de las relaciones de reactividad es de suma importancia ya que nos proporciona información acerca de la composición media y la distribución estadística de secuencias de monómeros en el sistema polimérico. Dependiendo de la reactividad de los monómeros, la composición en la alimentación y la conversión, se obtienen macromoléculas que difieren significativamente en composición y en ocasiones en compatibilidad, llegándose a formar en casos extremos mezclas poliméricas. Dependiendo de los valores de las relaciones de reactividad se obtienen diferentes distribuciones de los comonómeros en el copolímero. En la Tabla 4.1 se muestran los diferentes copolímeros obtenidos en función de los valores de r_1 y r_2 .

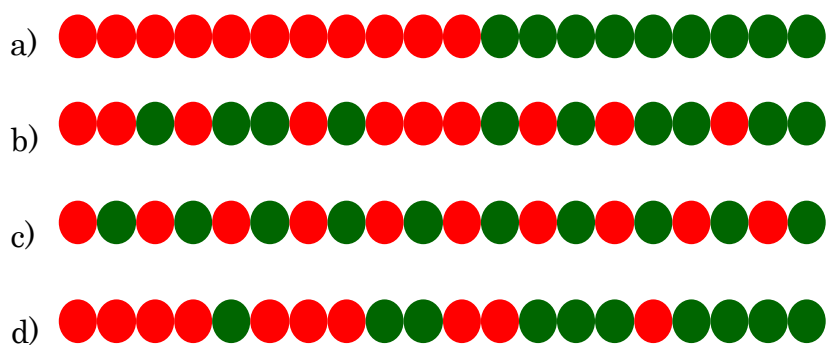
r_1	r_2	Copolímero
1	1	Al Azar
0	0	Alternante
> 1	< 1	Enriquecido en M_1
< 1	< 1	Azeotrópico

Tabla 4.1. Clasificación de copolímeros en función de los valores de relaciones de reactividad.

El comportamiento de la mayoría de los sistemas poliméricos se encuentra entre una copolimerización ideal ($r_1 \times r_2 = 1$) y una copolimerización alternante ($r_1 = r_2 = 0$). A medida que $r_1 \times r_2$ disminuye

desde la unidad hasta cero, aumenta la tendencia a la copolimerización alternante. Una situación especial se da cuando uno de los monómeros posee una reactividad mucho mayor que el otro, es decir $r_1 \gg 1$ y $r_2 \ll 1$, en la que ambas especies en propagación adicionan preferentemente el monómero M_1 , resultando un copolímero enriquecido en ese comonómero a bajas conversiones. Otro caso especial se da cuando ambas relaciones de reactividad son inferiores a la unidad, y en el que la curva de composición en alimentación frente a la del copolímero atraviesa un punto en la línea obtenida cuando $r_1 = 1$ y $r_2 = 1$, denominado punto azeotrópico, donde la composición del copolímero se hace independiente de la conversión.

En los últimos años, y como consecuencia de la búsqueda de alternativas de trabajo diferentes a los copolímeros de bloque, las investigaciones científicas se han centrado en el desarrollo de copolímeros de gradiente, cuya especial microestructura les aporta interesantes propiedades y aplicaciones. Los copolímeros de gradiente se consideran el punto intermedio entre los copolímeros al azar y los de bloque, y se describen en general como aquellos en los que su composición cambia gradualmente a lo largo de la cadena macromolecular (Esquema 4.2d).^{15,16} Los copolímeros de gradiente se diferencian con respecto a los copolímeros de bloque por la transición gradual entre los monómeros A y B, mientras que los de bloque tienen una transición brusca entre los monómeros existentes en la cadena polimérica (Esquema 4.2a).¹⁷



Esquema 4.2. Representación de la secuencia de monómeros en un copolímero dibloque (a), al azar (b), alternante (c) y de gradiente (d).

Entre las aplicaciones de los copolímeros de gradiente, y derivadas de dicho cambio gradual de composición a lo largo de las cadenas poliméricas, destaca su uso como compatibilizantes de mezclas poliméricas^{18,19} y como materiales amortiguadores del sonido.^{20,21} Otras de sus aplicaciones importantes, y que hemos querido aprovechar en este trabajo, es que los copolímeros anfífilos de gradiente pueden autoensamblarse en medio acuoso, proporcionando de este modo sistemas con numerosas aplicaciones en el campo de los biomateriales y como sistemas de liberación de fármacos.²²⁻²⁵

Los copolímeros de gradiente pueden ser preparados a través de polimerizaciones controladas (CRP),²⁶⁻³¹ como por ejemplo por polimerización radical de transferencia de átomo (ATRP),³²⁻³⁵ polimerización por adición-fragmentación y transferencia reversible (RAFT)^{36,37} o por polimerización mediada por nitróxidos (NMP),³⁸⁻⁴⁰ así como a través de polimerizaciones aniónicas⁴¹ o catiónicas, o por polimerización metatética de apertura de anillo (*ROMP*).⁴³⁻⁴⁵ Para preparar copolímeros de gradiente mediante técnicas CRP es fundamental que los monómeros empleados presenten diferente reactividad, como es el caso de la

polimerización del acrilato de butilo con acrilonitrilo,⁴⁶ con estireno^{47,48} o con monómeros metacrílicos,⁴⁹⁻⁵¹ sistemas ampliamente estudiados en los últimos años.

Sin embargo, además de obtener copolímeros de gradiente mediante las técnicas de polimerización radical controlada que se acaban de citar, también es posible la preparación de éstos mediante técnicas de polimerización convencional, siempre y cuando se cumpla el requisito de emplear monómeros con una gran diferencia de reactividad entre ellos. En este caso se obtienen como resultado cadenas poliméricas cuya composición instantánea es diferente al principio y al final de la reacción, ya que a baja conversión las cadenas estarán enriquecidas en el monómero más reactivo y es al final de la reacción cuando se incorpora el menos reactivo, obteniendo así el gradiente composicional a lo largo de la cadena macromolecular.

Teniendo en cuenta este concepto, nuestro grupo de investigación ha preparado recientemente mediante polimerización radical convencional, copolímeros de gradiente con aplicaciones en el área de los biomateriales y liberación de fármacos, siempre sobre la base de la utilización de monómeros con diferente reactividad química.^{52,53} Esta técnica, mucho más sencilla que las anteriormente citadas tipo CRP, nos permite obtener copolímeros de gradiente de peso molecular controlado y valores de polidispersidad próximos a los obtenidos mediante CRP, además de no presentar el inconveniente del uso de metales como el cobre que pueden interferir en la citotoxicidad y biocompatibilidad del material preparado.

Así, en este trabajo se plantea el objetivo de preparar mediante polimerización radical convencional copolímeros de gradiente para la liberación controlada de fármacos, concretamente de ibuprofeno, usando como monómero el derivado acrílico del ibuprofeno HEI. Dado que los monómeros acrílicos presentan una reactividad muy superior a la de

determinados monómeros vinílicos,⁵⁴⁻⁵⁷ la elección de un comonómero de estas características nos permite obtener copolímeros de gradiente mediante polimerización radical convencional al cumplirse el requisito imprescindible en la preparación de dichos sistemas (uso de monómeros con distinta reactividad). Aunque de todos los monómeros vinílicos utilizados en el área de los biomateriales destaca el uso de la *N*-vinilpirrolidona (VP),^{53,58-60} en este trabajo se ha usado como monómero vinílico el 1-vinilimidazol VI, el cual presenta una serie de propiedades físico-químicas muy interesantes que pueden ofrecernos numerosas ventajas y posibilidades en el diseño de aplicaciones biológicas tal y como se expone a continuación.

4.1.4 1-vinilimidazol como monómero

El imidazol es un compuesto de naturaleza hidrófila y capacidad ionizable cuya estructura forma parte de compuestos de interés biológico como la histidina o biotina. Debido a sus propiedades físico-químicas y terapéuticas numerosas investigaciones del área biomédica se han centrado en el desarrollo de fármacos del tipo antihistamínicos, antibacterianos y antifúngicos derivados de imidazol,⁶¹⁻⁶³ existiendo en el mercado productos como el ketoconazol, clotrimazol y miconazol, fármacos antimetabólicos y antifúngicos actualmente comercializados⁶⁴⁻⁶⁶ en los que el imidazol forma parte de su estructura.

El uso del imidazol en el área de la liberación de fármacos ha sido ampliamente estudiado debido a las múltiples ventajas físico-químicas que ofrece, siendo las más interesantes su sensibilidad al pH y la formación de complejos con metales. Así, polímeros basados en compuestos derivados de imidazol han sido desarrollados para preparar sistemas de liberación de fármacos con perfiles de liberación modulables en función del pH del medio como por ejemplo los descritos por Yu et al.⁶⁷ o sistemas formadores de

nanopartículas y micelas poliméricas sensibles al pH en los que el imidazol o sus derivados forman parte de ellas para el transporte y liberación de fármacos.⁶⁸⁻⁷¹

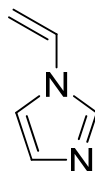


Figura 4.1. Estructura química del 1-vinilimidazol.

Dadas las interesantes ventajas que nos ofrece la molécula del imidazol, varios trabajos se han centrado en el uso del VI (Figura 4.1) como monómero para la formación de polímeros aplicables en el área de los biomateriales y de la liberación de fármacos. Por ejemplo, Fares et al.⁷² describen la síntesis de hidrogeles de p(1-vinilimidazol-co-acrilolmorfolina) sensibles al pH, óptimos para la preparación de dispositivos de andamiaje para la liberación controlada de fármacos. Otro ejemplo es la formación de micelas poliméricas a partir de copolímeros de bloque constituidos por VI sensibles al pH y a la temperatura para la liberación controlada y vectorizada de doxorubicina (fármaco anticancerígeno).⁷³ Velasco et al. detallan la síntesis de oligómeros de *N*-etilpirrolidona y VI que demuestran ser buenos candidatos como vectores no virales en terapia génica.⁷⁴ Por último, en la referencia de Sahiner et al.⁷⁵ se describen las diferentes aplicaciones de copolímeros de p(4-vinilpiridina-co-1vinilimidazol) como sistemas de liberación de principios activos.

Como ya hemos mencionado anteriormente, entre las propiedades químicas del imidazol cabe destacar también su capacidad de complejar metales. Así, en la bibliografía⁷⁶⁻⁷⁹ se describen complejos metálicos de zinc, cobalto, cadmio e indio con diferentes especies de imidazol. Desde hace

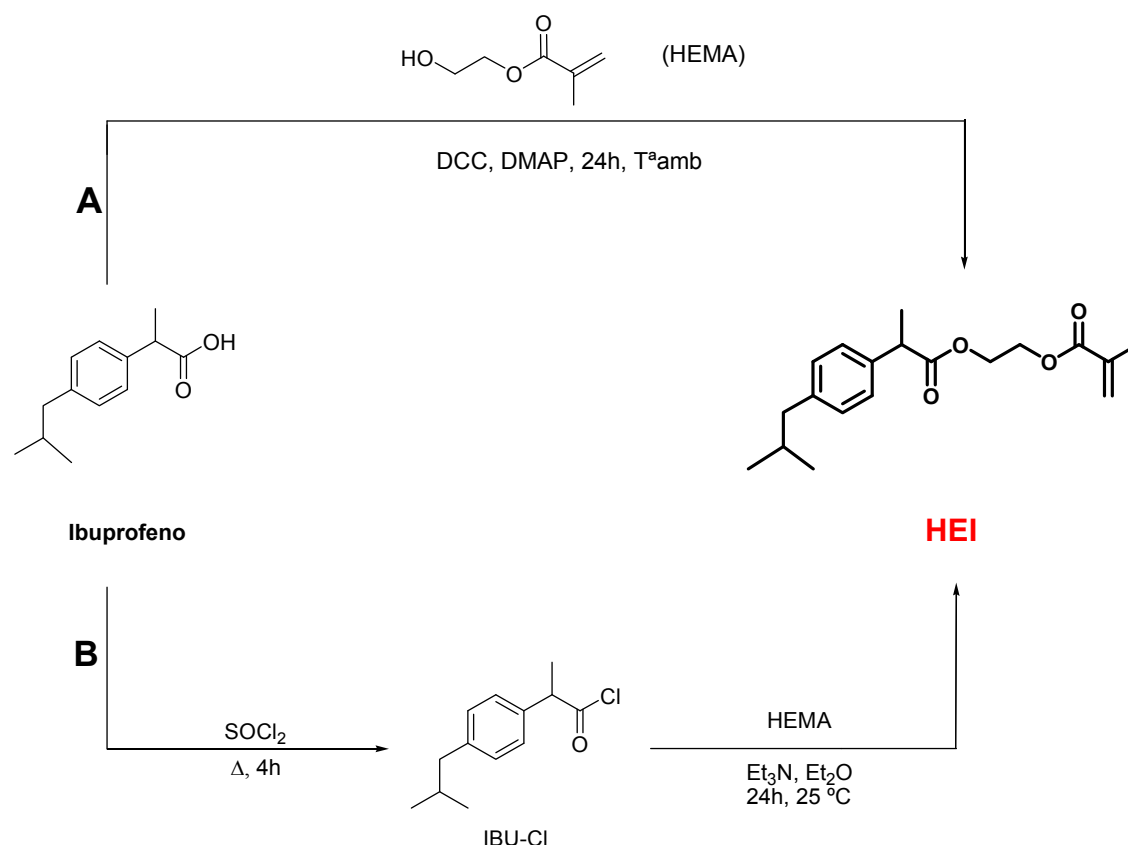
varios años, numerosos estudios ya han demostrado el alto poder complejante del homopolímero y copolímeros de VI y su aplicación práctica para la extracción y separación de metales de interés en el área de la salud.⁸⁰⁻⁸⁶

Por todas estas propiedades, en este trabajo se planteó la opción de usar el VI como monómero vinílico para preparar copolímeros de gradiente junto con el acrilato derivado de ibuprofeno HEI. La elección del VI en este trabajo se debe por tanto a la suma de diferentes propiedades físico-químicas, como su reactividad, capacidad amortiguadora de pH y capacidad de formar complejos con metales, así como su carácter hidrófilo que permite modular el carácter hidrófobo del monómero HEI. La suma de todas estas propiedades junto con las aportadas por el monómero HEI, así como la microestructura de los copolímeros preparados, serán claves en el comportamiento de estos sistemas y en el diseño de las posibles aplicaciones biológicas de dichos copolímeros tal y como se estudiará en el Capítulo 5.

4.2 SÍNTESIS DEL MONÓMERO DERIVADO DE IBUPROFENO (HEI)

El monómero metacrilato de 2-((2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoil}oxi)etilo (HEI) descrito en este trabajo ya había sido sintetizado previamente en nuestro grupo.⁸⁷ En los trabajos anteriores, la ruta de síntesis se llevaba a cabo en dos etapas a través de un mecanismo de reacción correspondiente a una esterificación de Fisher⁸⁸ en la que se hace reaccionar un cloruro de ácido con un alcohol primario (Esquema 4.3B). Para ello, era necesario en primer lugar la preparación del derivado halogenado de ibuprofeno, cloruro de 2-[4-(2-

metilpropil)fenil]propionilo (IBU-Cl), por reacción entre el fármaco y cloruro de tionilo. Posteriormente, se realizaba la etapa de esterificación entre el cloruro de ácido obtenido y HEMA.



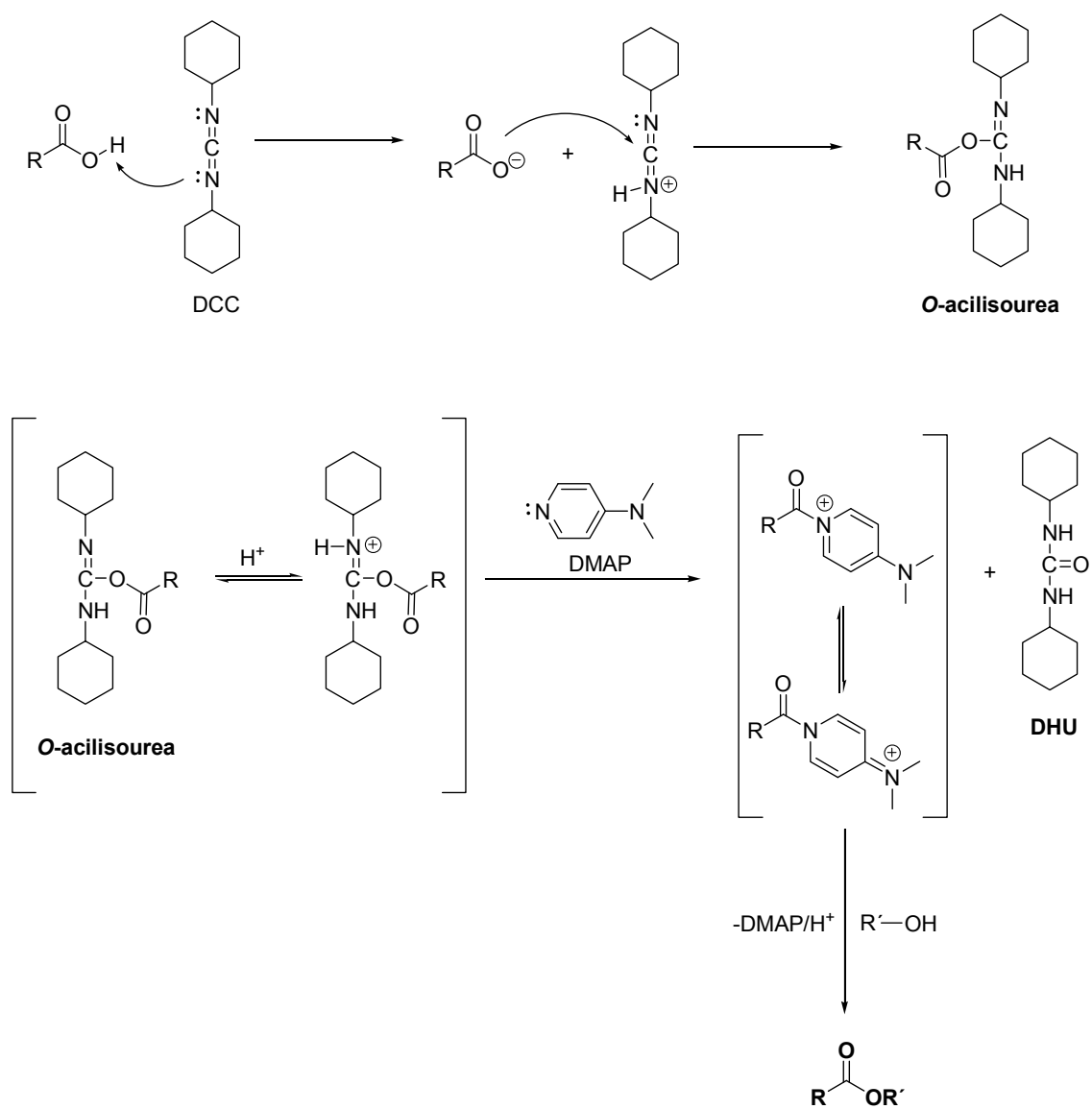
Esquema 4.3. Diferentes rutas para la síntesis del derivado acrílico de ibuprofeno (HEI) a través de una esterificación tipo Steglich (A) y a través del cloruro de ácido (B).

En este trabajo se ha seguido otro procedimiento sintético para obtener el monómero HEI (Esquema 4.3A), el cual nos ofrece varias ventajas respecto al anteriormente descrito, ya que en un solo paso se obtiene el producto deseado sin necesidad de sintetizar el cloruro de ácido, por lo que el

tiempo empleado en la síntesis es menor, obteniéndose además un mayor rendimiento y pureza del monómero HEI.

Siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 3 (apartado 3.2.1) se sintetiza el monómero HEI con un rendimiento global del 95%, obteniendo como producto un aceite de color blanco. El mecanismo de la reacción corresponde al de una esterificación de tipo Steglich,⁸⁹ que consiste en la formación de un éster por reacción del grupo ácido carboxílico del ibuprofeno con el alcohol del HEMA utilizando DCC como catalizador y DMAP como activador de la reacción. Este tipo de esterificación es un método de formación de ésteres en condiciones suaves muy popular en la síntesis de péptidos, y en general en el área de los biomateriales, donde los sustratos son sensibles a condiciones adversas como altas temperaturas.⁹⁰

El mecanismo de la reacción se detalla en el Esquema 4.4. El primer paso de la activación es la reacción del ácido carboxílico con la DCC para formar la *O*-acilisourea, compuesto intermedio que presenta una reactividad similar a los anhídridos de los ácidos carboxílicos. La adición de DMAP acelera la reacción, ya que al ser un nucleófilo más fuerte que el alcohol, va a reaccionar con la *O*-acilisourea formando un “éster activo” que reacciona rápidamente con el alcohol formando el éster final. La DMAP actúa por tanto, como un agente transferente de grupos acilo.⁹¹ Como producto de la reacción se forma también la diclohexilurea (DHU), sólido blanco en suspensión que es eliminado fácilmente por filtración una vez concluida la reacción de esterificación.



Esquema 4.4. Mecanismo de formación de ésteres por reacción de Steglich mediada por carbodiimina.

4.3 CARACTERIZACIÓN DEL MONÓMERO DERIVADO DE IBUPROFENO (HEI)

La estructura y pureza del monómero HEI portador de ibuprofeno se confirma mediante los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN (Figuras 4.2 y 4.3), comprobando la correcta reacción de esterificación entre el grupo ácido del fármaco y el alcohol del HEMA.

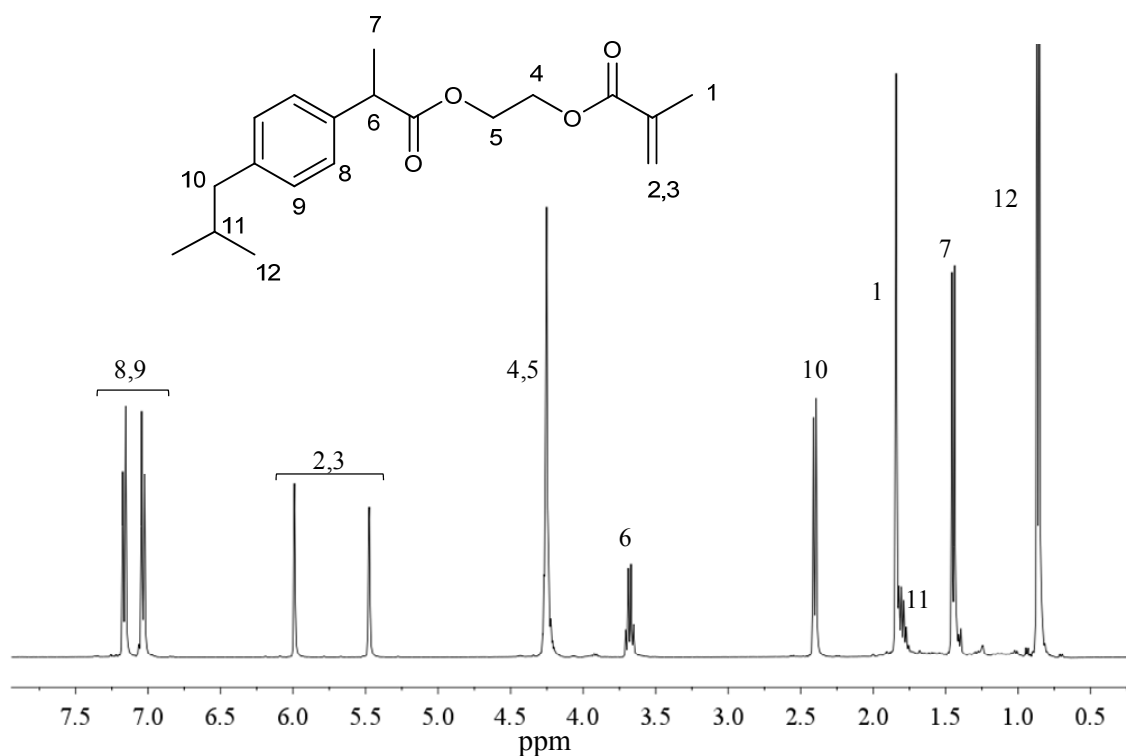


Figura 4.2. Estructura química, espectro y asignación de señales de ^1H -RMN del monómero HEI en CDCl_3 .

HEI: ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz, 25 °C): 7,23 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, Ar), 7,11 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, Ar), 6,07 (s, 1H, $\text{COCCH}_3=\text{CH}^{(\beta 2)}\text{H}$), 5,56 (s, 1H, $\text{COCCH}_3=\text{CH}^{(\beta 3)}\text{H}$), 4,36-4,31 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{O}$), 3,75 (c, 1H, $J = 7,2$ Hz, $\text{ArCHCH}_3\text{-CO}$), 2,47 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz, $\text{ArCH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,92 (s, 3H, COCCH_3), 1,92-1,81 (m, 1H, $\text{ArCH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,52 (d, 3H, $J = 7,2$ Hz, $\text{ArCHCH}_3\text{-CO}$), 0,93 (d, 6H, $J = 6,6$ Hz, $\text{ArCH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$).

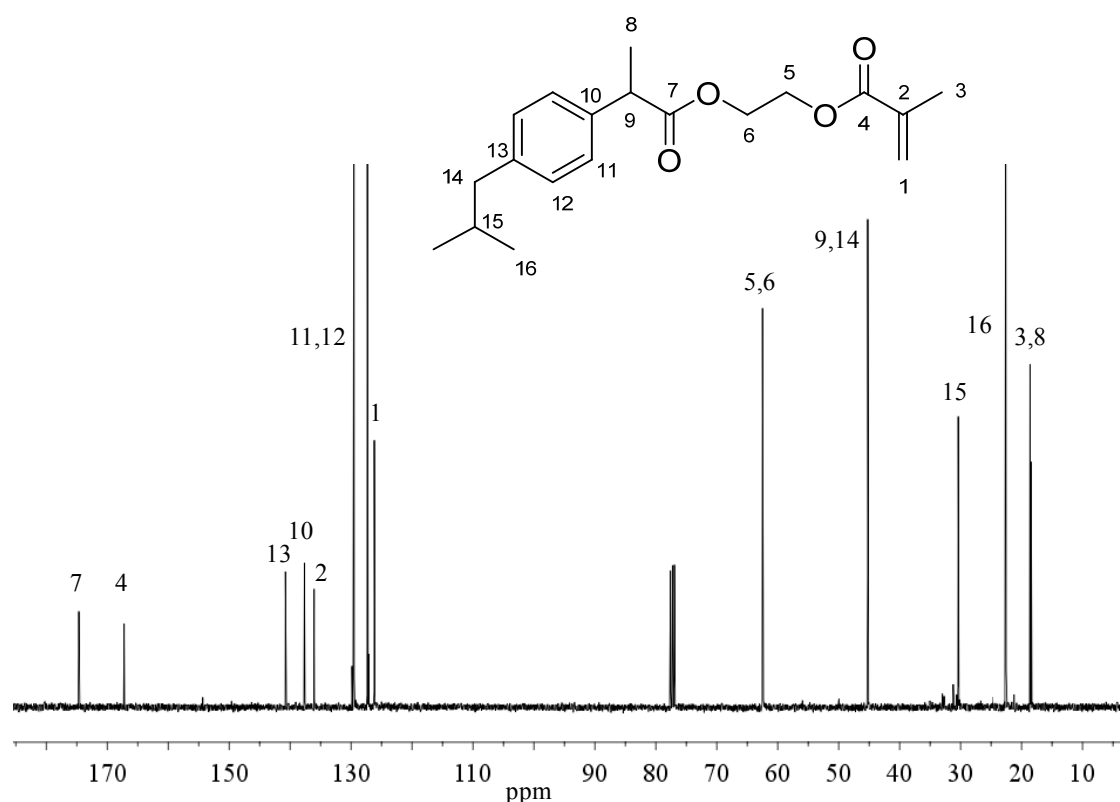


Figura 4.3. Estructura química, espectro y asignación de señales de ^{13}C -RMN del monómero HEI en CDCl_3 .

HEI : ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C) δ (ppm): 174,1 ($\text{Ar}-\text{CCH}_3-\underline{\text{C}}=\text{O}$), 165,6 ($\text{C}^\alpha-\underline{\text{C}}=\text{O}$), 140,0 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}-\text{CHCH}_3$), 138,2 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 136,3 ($\text{CH}_2=\underline{\text{C}}^\alpha$), 129,4 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{H}$), 127,3 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{H}$), 126,0 ($\underline{\text{C}}^\beta\text{H}_2=\text{CH}$), 63,1 ($\text{O}(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_2-\text{O}$), 45,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{C}_{\text{Ar}}$ y $\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)-\text{C}_{\text{Ar}}$), 30,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$), 23,4 ($\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 19,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3^\alpha$), 18,2 ($\text{C}_{\text{Ar}}-\text{CH}\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

La Figura 4.4 muestra los espectros de infrarrojo ATR-FTIR del ibuprofeno, del HEMA y del producto final de la reacción, el monómero HEI. Se comprueba que desaparecen las bandas correspondiente al grupo -OH del HEMA (3.500 cm^{-1}), confirmando la formación del enlace éster (1.745 cm^{-1}) entre el fármaco y el monómero metacrílico. El resto de las señales principales del monómero HEI se encuentran asignadas en la Tabla 4.2.

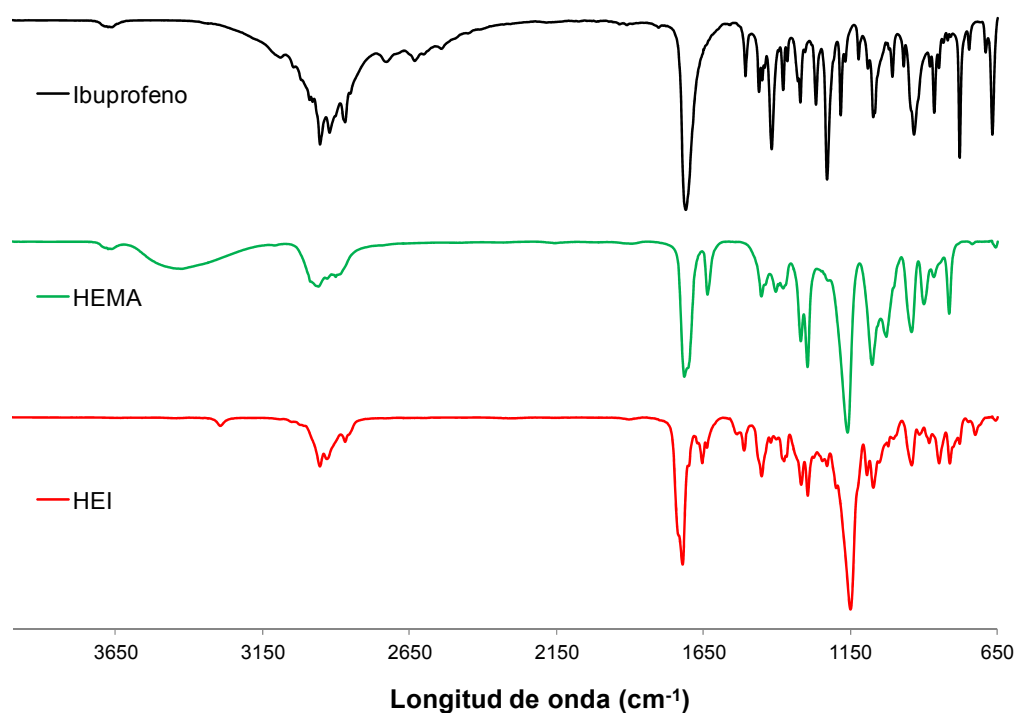


Figura 4.4. Espectros FTIR-ATR del ibuprofeno, HEMA y monómero HEI.

Longitud de onda (cm ⁻¹)	Asignación
2.950-2.850	$\nu_{C-H_{sp3}}$
1.745	$\nu_{C=O}$
1.620	$\nu_{C=C}$
1.155	ν_{C-O}

Tabla 4.2. Asignación de las principales bandas características del espectro infrarrojo del monómero HEI.

4.4 SÍNTESIS DE COPOLÍMEROS DE GRADIENTE DERIVADOS DE IBUPROFENO Y 1-VINILMIDAZOL, p(HEI-co-VI)

La obtención de los copolímeros p(HEI-co-VI) (%-molar) de 20:80, 50:50 y 80:20, nombrados como G37, G60 y G92 respectivamente, se lleva a cabo mediante polimerización radical en disolución según la metodología descrita en el Capítulo 3 (apartado 3.3.1). En la Figura 4.5 se muestra la estructura química de los copolímeros preparados.

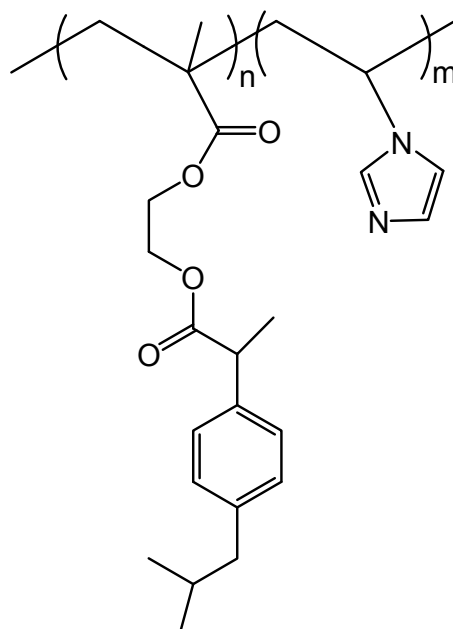


Figura 4.5. Estructura química de los copolímeros p(HEI-co-VI) sintetizados por polimerización radical en disolución.

4.5 CARACTERIZACIÓN DE COPOLÍMEROS DE GRADIENTE DERIVADOS DE IBUPROFENO Y 1-VINILIMIDAZOL, p(HEI-co-VI)

4.5.1 Caracterización mediante técnicas espectroscópicas

Mediante los espectros de RMN y espectroscopía infrarroja se caracterizan los productos obtenidos, se comprueba la ausencia de productos de partida y/o de reacciones secundarias y se determina la concentración molar de comonómeros en el copolímero.

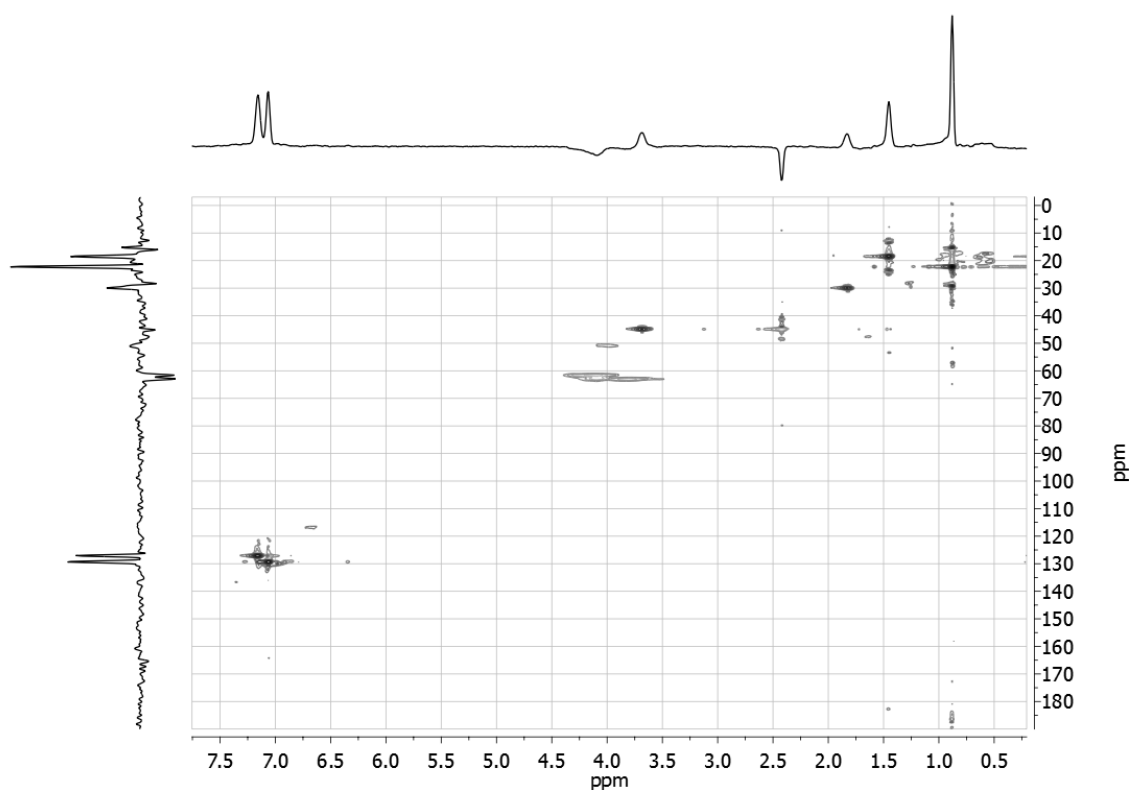


Figure 4.6. Espectro HMQC de correlación ^1H - ^{13}C del copolímero G60 en CDCl_3 .

Para la correcta asignación de las señales se emplean los espectros bidimensionales HMQC (Figura 4.6). Las Figuras 4.7 y 4.8 muestran a modo representativo el espectro de ^1H -RMN y de ^{13}C -RMN de uno de los copolímeros sintetizados (G60) junto con la estructura del mismo y la asignación de las correspondientes señales. La formación del polímero se demuestra por la desaparición de las señales de los protones vinílicos correspondientes a los monómeros HEI (5,89 ppm y 5,58 ppm) y VI (5,43 ppm y 4,83 ppm), confirmando así el progreso de la reacción y la ausencia de monómero residual. Además, se observa el ensanchamiento de las señales propio del carácter macromolecular.

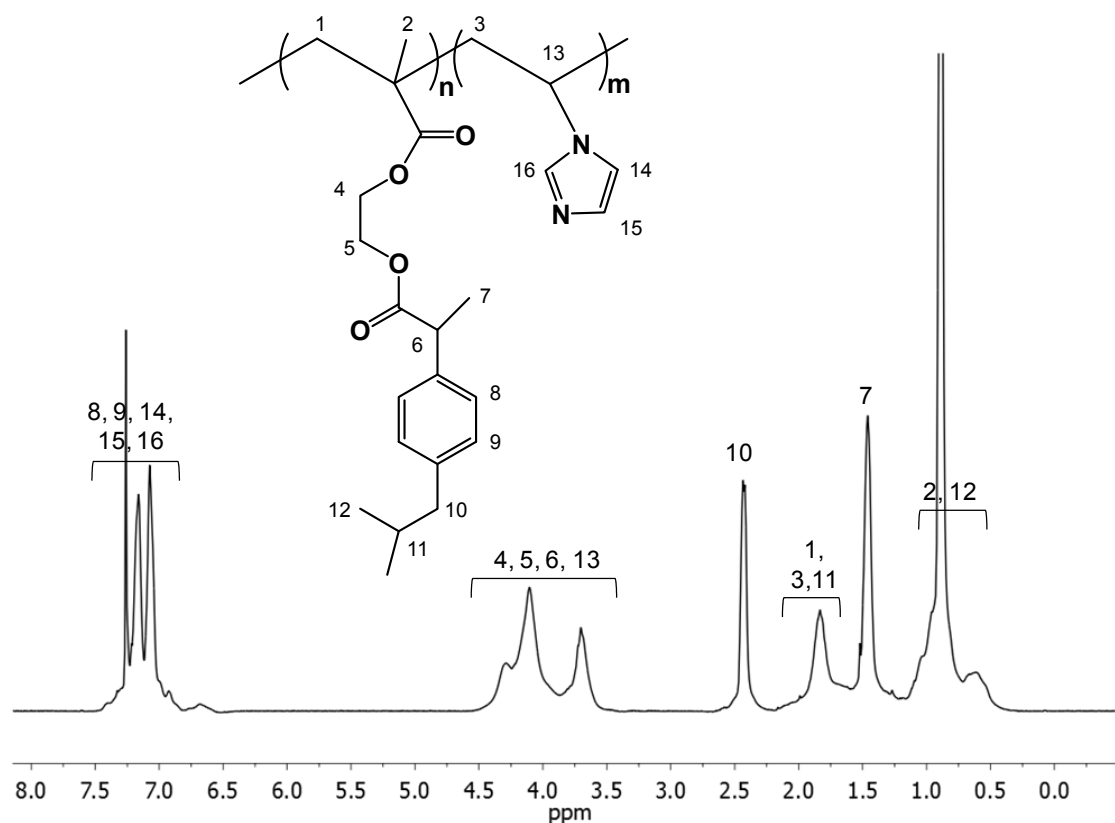


Figura 4.7. Estructura química, espectro y asignación de señales de ^1H -RMN del copolímero G60 en CDCl_3 .

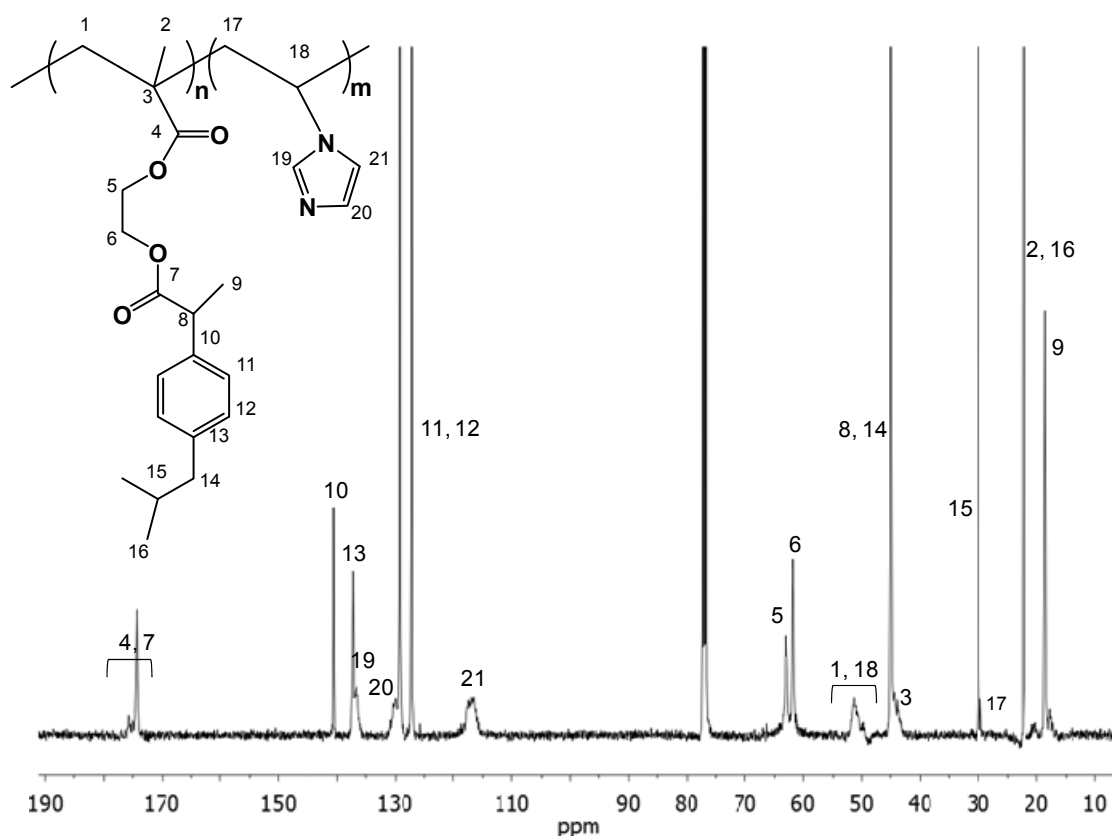


Figure 4.8. Estructura química, espectro y asignación de señales de ^{13}C -RMN del copolímero G60 en CDCl_3 a 25°C .

p(HEI-co-VI): ^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz, 40°C) δ (ppm): 7,35 (sa, 1H, $\text{NCHN}^{(\text{VI})}$), 7,16 (sa, 2H, CH_{Ar}), 7,06 (sa, 2H, CH_{Ar}), 7,01 – 6,80 (m, 1H $\text{NCHCHNC}^{\alpha(\text{VI})}$), 6,67 (sa, 1H, $\text{NCHCHNC}^{\alpha(\text{VI})}$), 4,40 – 3,95 (m, 4H, $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}$), 3,90 – 3,52 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-C}_{\text{Ar}}$ y $\text{CH}_2\text{-CH-N}^{(\text{VI})}$), 2,43 (sa, 2H, $\text{ArCH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,10 – 1,52 (m, 5H, $\text{CH}_2^{(\beta)}$, $\text{CH}_2^{(\beta\text{VI})}$, $\text{ArCH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,46 (sa, 3H, $\text{ArCHCH}_3\text{-CO}$), 1,13-0,44 (m, 9H, $\text{CH}_3^{(\alpha)}$, $\text{ArCH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 75 MHz, 40°C) δ (ppm): 175,7 ($\text{C}^\alpha\text{-C=O}$), 174,3 ($\text{Ar-CCH}_3\text{-C=O}$), 140,6 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-CHCH}_3$), 137,3 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 136,6 ($\text{NCHN}^{(\text{VI})}$), 130,4 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NC}^{\alpha(\text{VI})}$), 129,3 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 127,1 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{H}$), 117,0 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NC}^{\alpha(\text{VI})}$), 63,1 ($\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}$), 61,7 ($\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}$), 51,3 ($\text{NC}^{\alpha(\text{VI})}$), 49,8 (C^βH_2), 45,0 ($\text{CH}_2\text{-C}_{\text{Ar}}$ y $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-C}_{\text{Ar}}$), 44,0 ($\text{CH}_3^{(\alpha)}$), 30,0 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 29,6 ($\text{NCH}_2^{(\beta\text{VI})}$), 22,3 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 18,6 ($\text{CH}_3^{(\alpha)}$), 17,8 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-CHCH}_3$).

La Tabla 4.3 muestra la composición molar en la alimentación y en el copolímero de los tres sistemas preparados. La composición molar en el copolímero se calcula a partir de las integrales correspondientes a las señales de ^1H -RMN para los protones “4, 5, 6 y 13” de HEI y VI (3,52 – 4,40 ppm) con respecto a la de los protones “10” (2,43 ppm) de la unidad monomérica HEI (Figura 4.7). Con los valores de dichas integrales se resuelve el sistema de ecuaciones que nos proporciona la composición molar de los correspondientes copolímeros. Como se puede ver en la Tabla 4.3, los copolímeros p(HEI-co-VI) incorporan menos cantidad de VI respecto a la alimentación. Este hecho se debe, como se demostrará más adelante al calcular las relaciones de reactividad, a la baja reactividad del monómero VI.

	Alimentación (% mol)		Copolímero (% mol)		Rendimiento
	f(HEI)	f(VI)	F(HEI)	F(VI)	
G37	0,20	0,80	0,37	0,63	52%
G60	0,50	0,50	0,60	0,40	63%
G92	0,80	0,20	0,92	0,08	85%

Tabla 4.3. Composición molar en alimentación (*f*), en el copolímero (*F*) y rendimiento de reacción de los sistemas p(HEI-co-VI) preparados.

Los espectros de infrarrojo ATR-FTIR de los copolímeros se muestran en la Figura 4.9, observándose las bandas características de los distintos grupos funcionales presentes en los distintos copolímeros preparados, como por ejemplo, la debida al anillo imidazol ($\nu_{\text{N=C-H/C=C-H}} = 3.101 \text{ cm}^{-1}$) que aumenta su intensidad relativa al aumentar su contenido en el copolímero. Otras bandas significativas y su correspondiente asignación se encuentran recogidas en la Tabla 4.4.

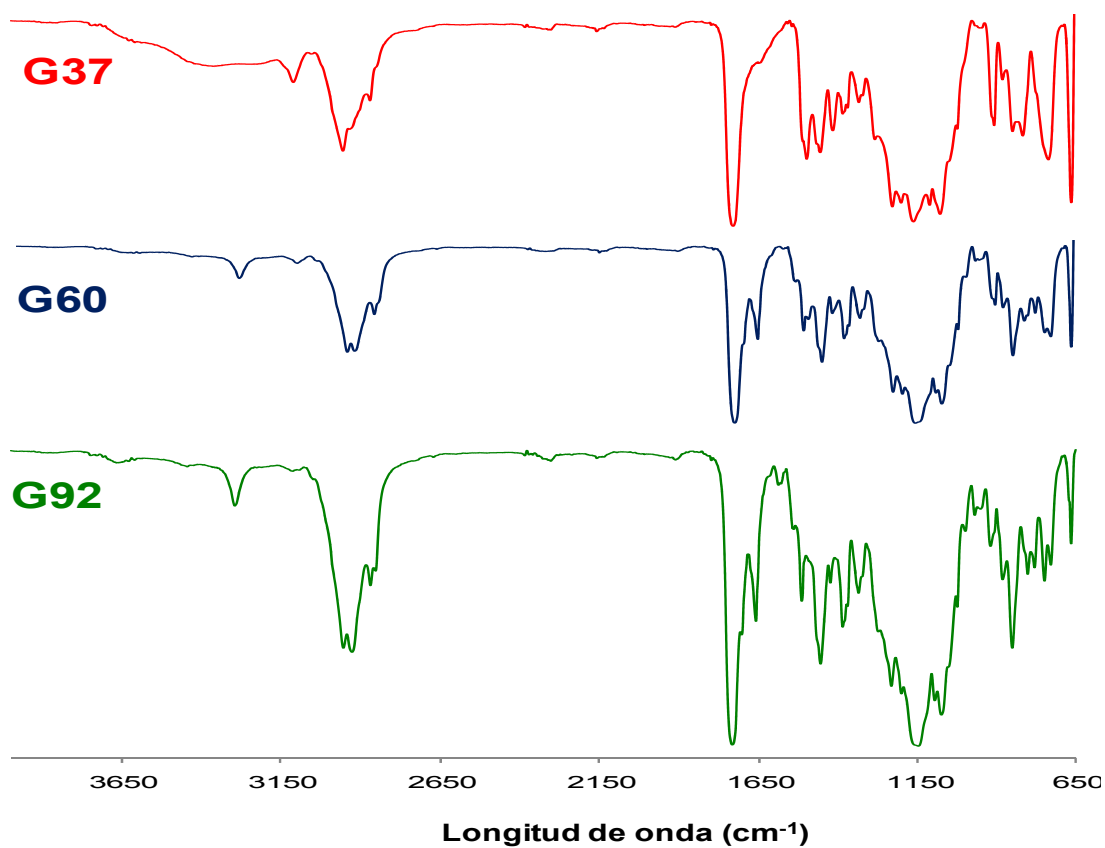


Figura 4.9. Espectros normalizados de ATR-FTIR de los copolímeros *p(HEI-co-VI)* preparados.

Longitud de onda (cm ⁻¹)	Asignación
3.101	$\nu_{\text{N=C-H/C=C-H}}$
2.952	$\nu_{\text{C-Hsp}^3}$
1.730	$\nu_{\text{C=O}}$
1.497	$\nu_{\text{C=C}}$
1.155	$\nu_{\text{C-O}}$
850	$\nu_{\text{C-HAr}}$

Tabla 4.4. Asignación de las bandas características de infrarrojo de los copolímeros *p(HEI-co-VI)*.

4.5.2 Cálculo de las relaciones de reactividad de los monómeros HEI y VI. Caracterización microestructural

Las relaciones de reactividad (r_1 y r_2) del monómero derivado de ibuprofeno y del VI se calculan siguiendo la metodología descrita en la bibliografía^{14,52} mediante la monitorización *in situ* por ^1H -RMN de la reacción de copolimerización y según el procedimiento descrito en el Capítulo 3 (apartado 3.4.4).

En la Figura 4.10 se muestra una secuencia de espectros a distintos tiempos de la reacción de polimerización. Para el cálculo de las concentraciones instantáneas de los monómeros se han integrado las señales H_{HEI} (5,89 ppm) y H_{VI} (5,43 ppm) asignadas a los protones acrílicos y vinílicos de los monómeros HEI y VI respectivamente, y que se han normalizado respecto a la señal de referencia de la DMF (2,9 ppm). Esta figura muestra a simple vista la diferencia de reactividad entre ambos monómeros.

En la Figura 4.11 se representa el diagrama de r_1 y r_2 correspondiente al sistema HEI:VI obtenido según el método descrito. Cada recta dibujada corresponde a los valores de las relaciones de reactividad calculadas para cada una de las reacciones analizadas (fracciones molares iniciales de HEI entre 0,4 y 0,8) tomando distintos valores iniciales x_0 , y_0 . La intersección de las tres rectas corresponde a los valores óptimos de r_1 y r_2 .

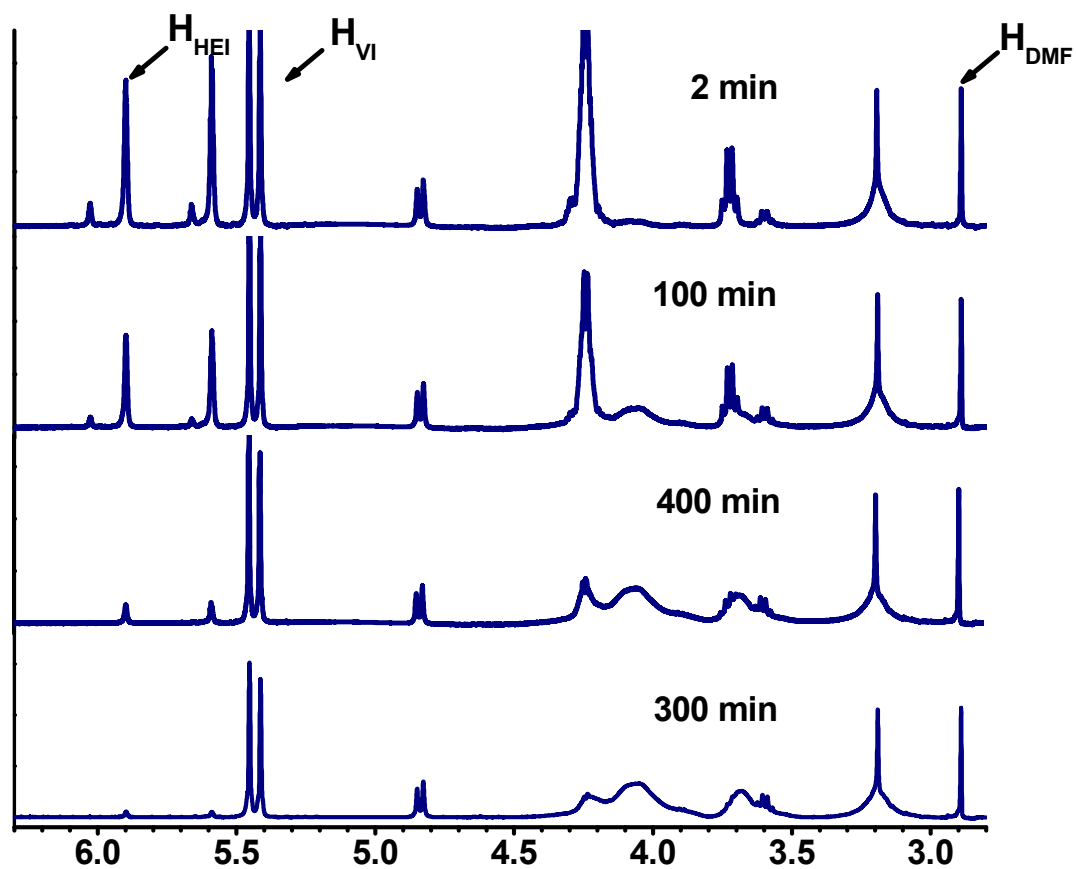


Figura 4.10. Espectros de ^1H -RMN para la reacción de copolimerización HEI:VI 40:60 a diferentes tiempos de reacción.

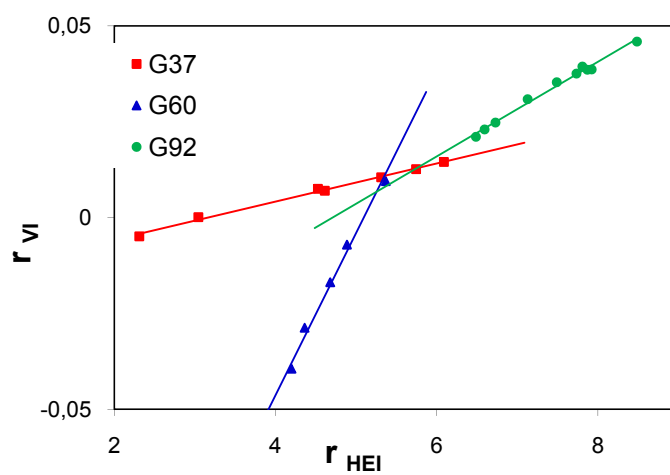


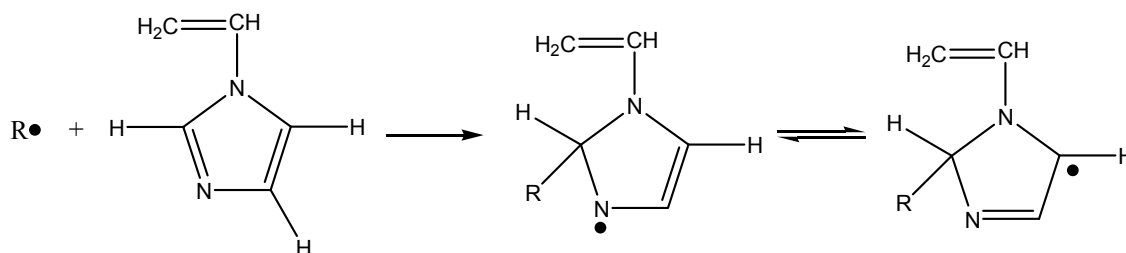
Figura 4.11. Relaciones de reactividad obtenidas para los monómeros HEI y VI.

Los valores de las relaciones de reactividad obtenidos para el sistema en estudio son: $r_{\text{HEI}} = 5,575 \pm 0,420$ y $r_{\text{VI}} = 0,012 \pm 0,006$. Esta diferencia de reactividad entre los monómeros se observa fácilmente en la anterior Figura 4.10 donde se puede apreciar cómo las señales pertenecientes al monómero HEI van disminuyendo rápidamente, mientras que las del VI apenas lo hacen.

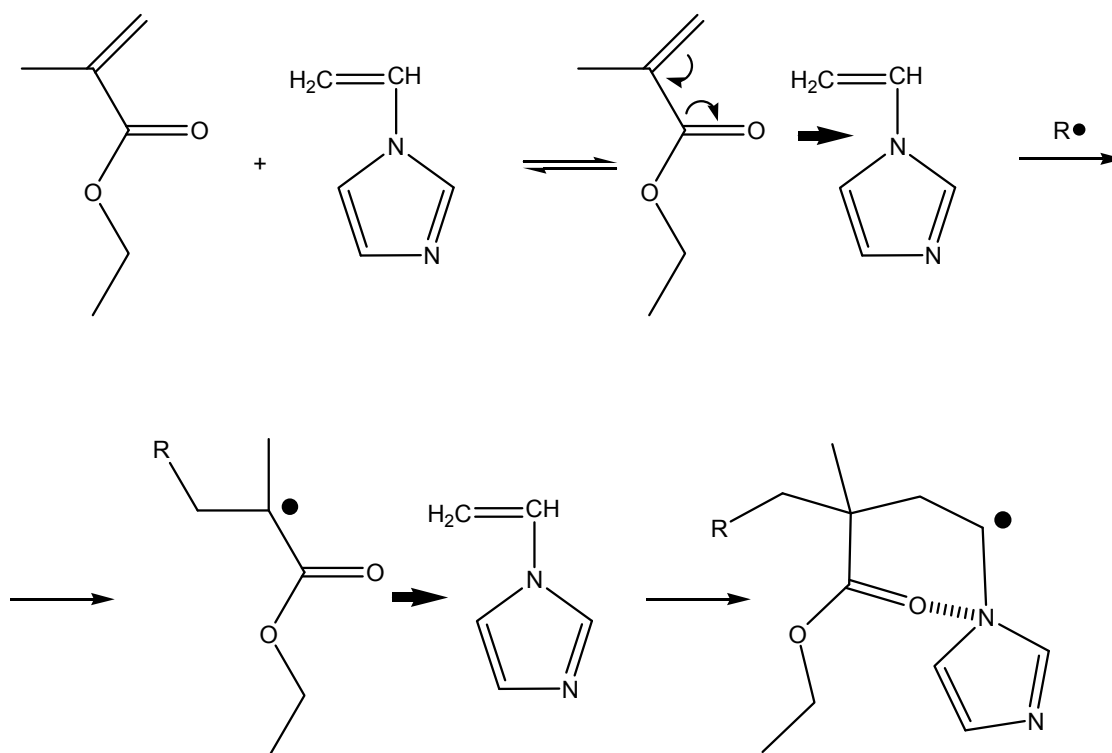
De acuerdo con la definición de las relaciones de reactividad, los valores obtenidos indican que se puede estimar que cinéticamente el monómero HEI se incorpora a cadenas con un extremo activo HEI con una velocidad $K_{\text{HEI-HEI}} = 5,57 K_{\text{HEI-VI}}$ y a extremos activos terminados en VI con una velocidad relativa $K_{\text{VI-HEI}} = 83,33 K_{\text{VI-VI}}$, mientras que para el monómero VI las correspondientes constantes cinéticas relativas son $K_{\text{HEI-VI}} = 0,18 K_{\text{HEI-HEI}}$ y $K_{\text{VI-VI}} = 0,012 K_{\text{VI-HEI}}$.

La baja reactividad del monómero VI ya ha sido estudiada por otros autores que proponen una desviación del clásico mecanismo de polimerización radical debido a reacciones de “adición degradativas” entre el monómero VI y las especies radicálicas en crecimiento que justifican los resultados obtenidos. Así, Bamford et al. sugieren un mecanismo de estabilización como el que aparece en el Esquema 4.5, en el que la incorporación de una unidad de VI a un radical en crecimiento se da en el anillo imidazol y no a través del doble enlace vinílico, formando así una especie estabilizada por la presencia de electrones deslocalizados en el anillo imidazol.⁹² Otros autores como Pekel et al. estudian la polimerización del VI con el metacrilato de etilo (EMA), obteniendo para este sistema unos valores de relaciones de reactividad aproximadamente de $r_{\text{VI}} = 0,35$ y $r_{\text{EMA}} = 3,47$ y sugieren que la baja reactividad del VI se debe a la formación de un complejo entre el grupo carbonilo del EMA y el anillo imidazol (Esquema 4.6), formándose una especie radicálica estabilizada y que impide la adición de VI pero favorece la adición de EMA.⁵⁷ Es decir, según este mecanismo, al

polimerizar el VI con derivados acrílicos se acelera la adición de éstos últimos, dificultando la adición de VI, justificando así la obtención de cadenas macromoleculares enriquecidas en el monómero metacrílico al principio de la reacción.



Esquema 4.5. Mecanismo de estabilización del VI mediante reacción de adición degradativa.



Esquema 4.6. Mecanismo de autoaceleración de la polimerización radical entre acrilatos y VI.

La Figura 4.12, obtenida a partir de los valores de r_{HEI} y r_{VI} , muestra la predicción de la evolución de la composición del copolímero en función de la conversión y la concentración en la alimentación. Cada una de las líneas representadas en la gráfica indica el curso que seguiría la reacción de polimerización para las composiciones HEI:VI preparadas en este trabajo. De esta figura se obtiene una valiosa información, ya que nos permite deducir cómo el sistema p(HEI-co-VI) evoluciona a lo largo de la reacción: inicialmente se forman cadenas ricas en HEI (el monómero más reactivo) y a mayores conversiones secuencias ricas en VI (el menos reactivo).

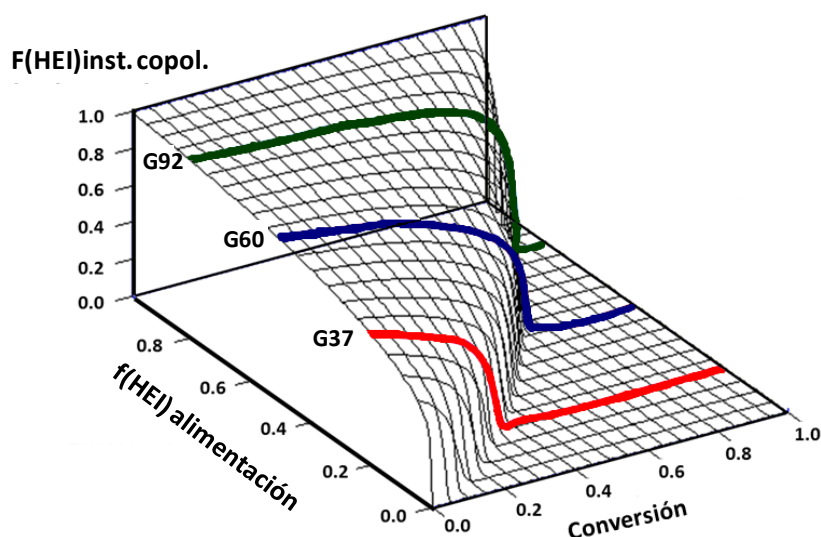


Figura 4.12. Concentración instantánea de HEI en los copolímeros p(HEI-co-VI) en función de la conversión y la concentración de HEI en la alimentación.

La Figura 4.13A muestra el diagrama teórico de composición del sistema y la Figura 4.13B el análisis estadístico de distribución de secuencias. El diagrama 4.13A nos aporta una idea de la composición molar instantánea en el copolímero a partir de una determinada fracción molar en la alimentación. La Figura 4.13B muestra la distribución estadística de los monómeros en términos de triadas centradas en HEI en función de la

fracción molar de este monómero en la alimentación. Las fracciones molares obtenidas están de acuerdo con la discusión previa y corrobora la formación de dos especies predominantes, cada una de ellas rica en uno de los componentes. Al ser el componente 1 (HEI) mucho más reactivo que el 2 (VI), en el caso de altas composiciones iniciales de 1 y a bajas conversiones se forman preferentemente triadas 111; mientras que a altas conversiones y altas composiciones iniciales de 2, se forman triadas 222. Las heterotriadas (112+211 y 212) se forman en pequeña proporción a lo largo de la reacción.

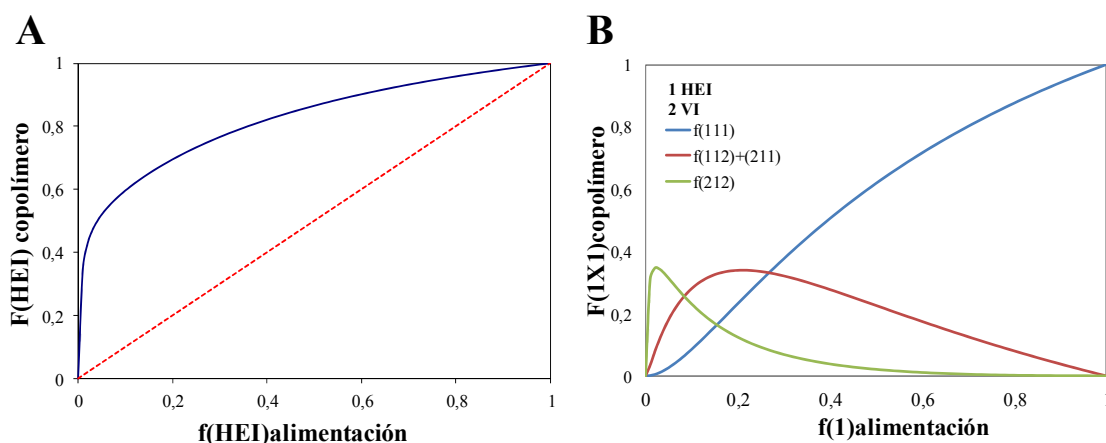


Figura 4.13. (A) Diagrama de composición del sistema $p(\text{HEI-co-VI})$.
(B) Distribución de triadas centradas en HEI.

La determinación de las relaciones de reactividad nos permite tener una idea de la distribución microestructural de las secuencias monoméricas y de la heterogeneidad composicional de las macromoléculas sintetizadas a alta conversión. Como ya hemos comentado, dada la diferencia de reactividad, tiene lugar la formación de cadenas poliméricas con secuencias ricas en el monómero más reactivo (HEI) seguidas de secuencias ricas en el menos reactivo (VI), por lo que los polímeros sintetizados presentan un gradiente composicional a lo largo de la cadena macromolecular formada. Teniendo en cuenta este gradiente composicional junto con el carácter hidrófobo del monómero HEI e hidrófilo del monómero VI, podemos decir

que los copolímeros p(HEI-co-VI) presentan propiedades anfífilas como consecuencia de la separación a lo largo de la cadena de un dominio mayoritariamente hidrófobo seguido de otro hidrófilo. Este carácter anfílico será una propiedad determinante en el comportamiento en medio acuoso de estos sistemas como se estudiará más adelante en el Capítulo 5.

Además, la diferencia de reactividad entre ambos monómeros repercute no sólo en las características microestructurales de las cadenas poliméricas formadas sino también en la composición de las mismas, tal y como se refleja en la Tabla 4.3, así como en otras propiedades como el peso molecular y temperatura de transición vítrea de los copolímeros preparados tal y como se expondrá en los siguientes apartados.

4.5.3 Caracterización mediante técnicas cromatográficas

El peso molecular de los polímeros es una propiedad de gran importancia para su aplicación, ya que su utilidad y propiedades mecánicas asociadas dependen de este parámetro.

Siguiendo el método descrito en el Capítulo 3 (apartado 3.4.2) se determinan los valores de M_w , M_n e IP de los copolímeros preparados. Para todas las composiciones se obtienen curvas de distribución unimodales y los resultados se encuentran recogidos en la Tabla 4.5, observando claramente el aumento del valor de M_w y M_n a medida que aumenta el contenido en HEI en el copolímero. Uno de los resultados más interesantes de este trabajo es la obtención de valores de IP relativamente más bajos de lo esperable en un mecanismo de copolimerización radical ($M_w/M_n > 2$), el cual va aumentando conforme disminuye la concentración de VI, alcanzándose valores más próximos a los esperados en polimerizaciones radicales en el caso de la

composición G92. Los bajos valores de M_w , M_n e IP obtenidos para los copolímeros p(HEI-co-VI) son acordes a los recogidos en investigaciones anteriores sobre la polimerización radical de VI con monómeros metacrílicos^{57,93,94} y pueden ser justificados, como ya hemos comentado anteriormente, por el efecto de la estabilización de los macrorradicales al incorporarse a la cadena en la etapa de propagación una molécula de VI.

SEC			
Copolímero	M_w	M_n	M_w/M_n
G37	16146	10417	1,5
G60	32406	17660	1,8
G92	32163	16580	1,9

Tabla 4.5. Pesos moleculares promedio en peso (M_w), en número (M_n) e índice de polidispersidad (M_w/M_n) medidos por SEC de los sistemas p(HEI-co-VI) preparados.

4.5.4 Caracterización mediante técnicas calorimétricas

La determinación de la T_g de los copolímeros p(HEI-co-VI) se realiza según el procedimiento descrito en el Capítulo 3 (apartado 3.4.3) y los resultados obtenidos se exponen en la Tabla 4.6. El homopolímero p(HEI), preparado en anteriores trabajos,⁸⁷ tiene un valor de T_g de 24 °C mientras que la T_g del homopolímero p(VI) es de 167 °C.⁷⁴ Como se observa en la Tabla 4.6 la T_g de los copolímeros presenta valores intermedios entre ambos homopolímeros, aumentando a medida que aumenta el contenido en VI.

DSC	
Copolímero	T _g (°C)
G37	48
G60	46
G92	27

Tabla 4.6. Temperatura de transición vítrea (T_g) de los sistemas $p(HEI-co-VI)$ preparados.

Los valores de T_g de los distintos copolímeros fueron analizados considerando la ecuación de Fox:

$$\frac{1}{T_g} = \frac{w_1}{T_{g1}} + \frac{w_2}{T_{g2}}$$

donde T_{g1} y T_{g2} son las temperaturas de transición vítreas de los homopolímeros del sistema y T_g la temperatura de transición vítrea del copolímero correspondiente. Según esta teoría, la desviación positiva o negativa de esta ecuación indica la presencia de interacciones intra o intermoleculares entre las cadenas.⁹⁵

Los valores de T_g de los copolímeros en estudio a las composiciones molares preparadas se ajustan relativamente bien a la ecuación de Fox (Figura 4.14), por lo que se puede deducir que la contribución de las unidades monoméricas a la flexibilidad de las cadenas es aditiva, es decir, ambos monómeros no interaccionan específicamente y contribuyen a los segmentos macromoleculares como componentes aislados. Este hecho está de acuerdo con la tendencia ya demostrada al estudiar las relaciones de reactividad de la formación de bloques, hecho que provoca que la interacción entre unidades adyacentes (responsable de la desviación de la ecuación de Fox) esté minimizada.

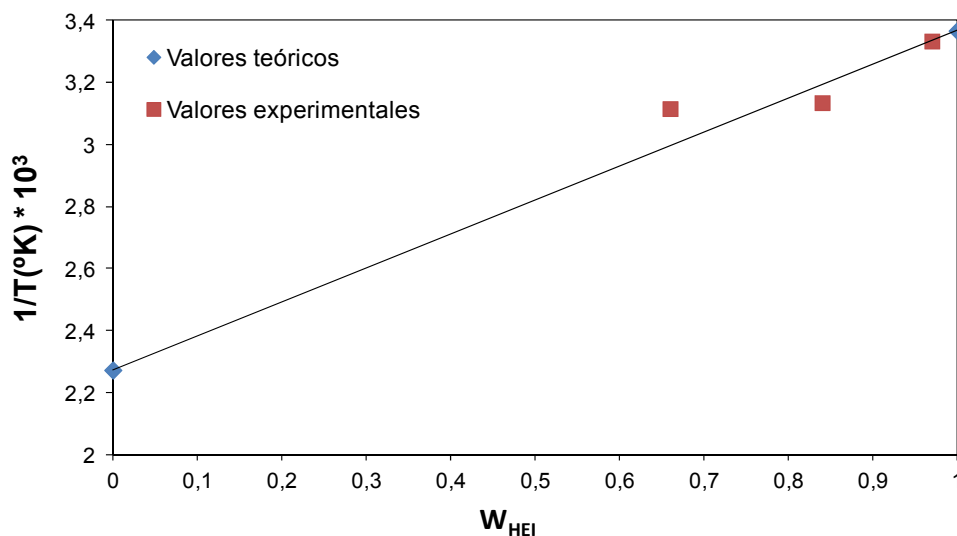


Figura 4.14. Variación del inverso de la T_g teórica de los homopolímeros (\blacklozenge) y las obtenidas experimentalmente (\blacksquare) de los sistemas $p(\text{HEI-co-VI})$ frente a la fracción en peso de HEI en el copolímero.

4.5.5 Comportamiento *in vitro*

4.5.5.1 Determinación del ángulo de contacto

Las propiedades hidrofílicas o hidrofóbicas de una superficie (humectabilidad) se caracterizan por el ángulo de contacto que se forma entre una gota de agua y la superficie en estudio.⁹⁶ La humectabilidad de un biomaterial es un parámetro importante a tener en cuenta en la evaluación de su futura aplicación debido a su influencia en la biocompatibilidad del mismo ya que afecta, entre otros, a la adsorción de proteínas, a la adhesión y activación de las plaquetas, a la coagulación de la sangre o a la adhesión celular y bacteriana.^{97,98}

En la Tabla 4.7 se muestran los valores de los ángulos de contacto obtenidos para los copolímeros $p(\text{HEI-co-VI})$. Se observa cómo los valores disminuyen al aumentar el contenido en VI como consecuencia del aumento de la hidrofilia asociada a este monómero. Los altos valores obtenidos

pueden deberse a la presencia de homotriadas de HEI de marcado carácter hidrófobo formadas durante la reacción de polimerización, tal y como hemos visto al estudiar la microestructura de los copolímeros.

Ángulo de contacto	
Copolímero	θ_{H_2O}
G37	$86,5 \pm 1,3$
G60	$93,4 \pm 1,2$
G92	$93,8 \pm 1,9$

Tabla 4.7. Ángulos de contacto en agua (θ_{H_2O}) obtenidos para los copolímeros *p*(HEI-co-VI).

4.5.5.2 Liberación de ibuprofeno

Dada la presencia del enlace éster hidrolizable que une el ibuprofeno al esqueleto polimérico, se lleva a cabo el estudio de liberación *in vitro* del fármaco a pH 7 y 10 según el procedimiento descrito en el Capítulo 3 (apartado 3.4.6.2). No se realiza el estudio a pH ácido dada la baja solubilidad del fármaco.

Los perfiles de liberación de ibuprofeno en los distintos medios tamponados a partir de pastillas de las tres composiciones poliméricas *p*(HEI-co-VI) se muestran en la Figuras 4.15 y 4.16, observándose en todos los casos porcentajes de liberación de ibuprofeno relativamente bajos tras más de cuarenta días de estudio. El bajo grado de hidratación de la matriz polimérica, debido al carácter hidrófobo del fármaco, dificulta el acceso de las moléculas de agua para producir la hidrólisis del mismo. Este hecho se

pone de manifiesto en los resultados, indicando la estabilidad del enlace éster entre la cadena polimérica y el fármaco, pudiendo ser éste un efecto favorable a la hora de preparar formulaciones que precisen cinéticas lentas de liberación, como es el caso de recubrimientos de dispositivos vasculares con actividad a largo plazo. De todas formas, hay que tener en cuenta que siempre es arriesgado extrapolar los resultados *in vitro* al verdadero comportamiento *in vivo*, donde la acción hidrolítica de las enzimas juega un papel importante favoreciendo la hidrólisis del fármaco.

Los resultados obtenidos pueden ser explicados basándonos en un mecanismo de liberación análogo al desarrollado en nuestro grupo de investigación denominado “Progressive accessibility model”⁹⁹ el cual tiene en cuenta las características microestructurales del copolímero. Según la Figura 4.14B, vemos que la composición G60 presenta un alto porcentaje de heterotriadas HEI-VI, que favorece, mediante un mecanismo “en cremallera” (unzipping mechanism),⁹⁹ el acceso del agua al interior de la matriz polimérica permitiendo de esta forma la hidrólisis del enlace éster y liberación del fármaco. Según este mecanismo en cremallera, a medida que se libera ibuprofeno los restos de HEI se convierten en HEMA, creando así dominios con mayor carácter hidrófilo en la zona que facilita la posterior liberación de unidades de HEI próximas. La presencia de unidades hidrófilas de VI intercaladas entre secuencias largas de HEI crea también puntos de acceso a las moléculas de agua favoreciendo así la hidrólisis del fármaco. Ese tipo de cinética de liberación ha sido descrita con anterioridad para sistemas acrílicos similares portadores de fármacos en los que la hidrofilia del sistema aumenta a medida que se libera el fármaco al medio.¹⁰⁰

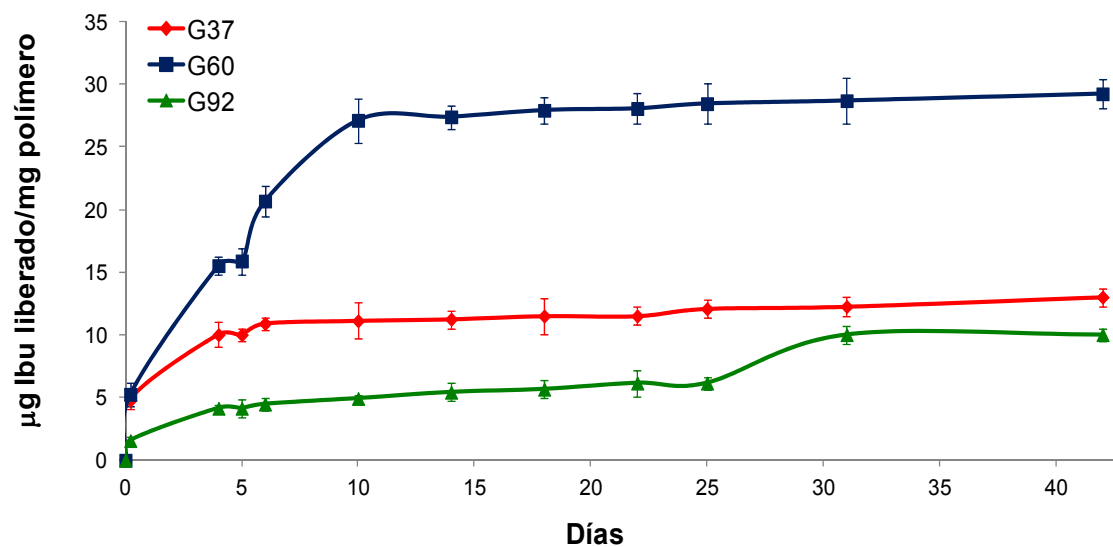


Figura 4.15. Perfiles de liberación de ibuprofeno a pH 7 a partir de los sistemas $p(HEI-co-VI)$.

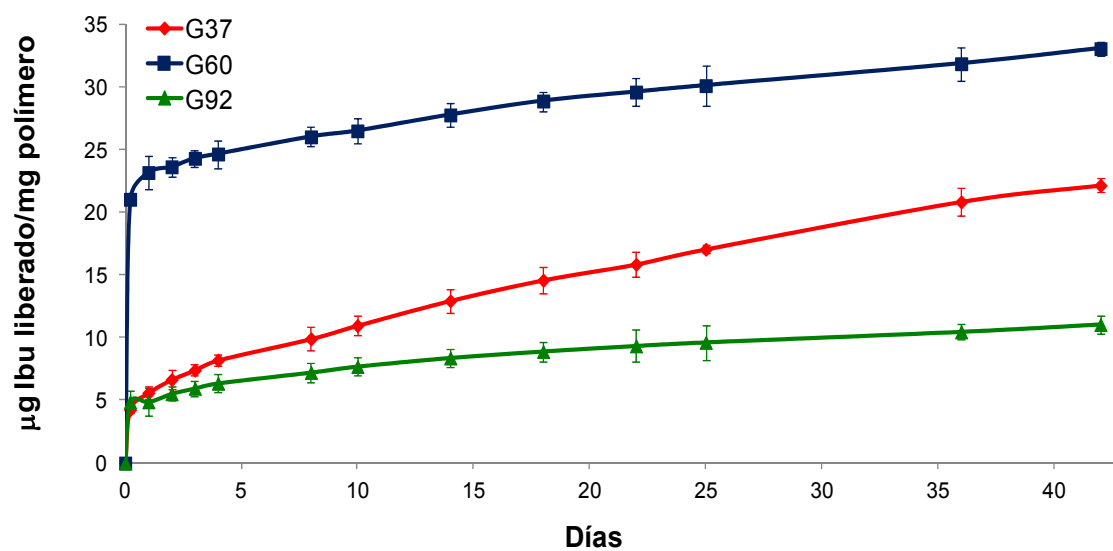


Figura 4.16. Perfiles de liberación de ibuprofeno a pH 10 a partir de los sistemas $p(HEI-co-VI)$.

En las gráficas anteriores se puede observar que la cantidad de fármaco liberado depende tanto del pH del medio como de la composición del copolímero portador del fármaco. Dado que a pH básico está favorecida la hidrólisis del enlace éster que une el fármaco a la cadena polimérica, todas las composiciones muestran porcentajes mayores de liberación a pH 10.

Por otro lado, la cantidad de fármaco anclado a la cadena polimérica, y su correspondiente grado de hidrofobicidad asociado, conlleva a que se establezca un balance competitivo en la capacidad de liberación del fármaco. Estos resultados ponen de manifiesto el mayor carácter hidrófobo de los copolímeros según presentan mayor contenido en HEI, el cual influye directamente en la velocidad de hidrólisis de los materiales poliméricos. Es por este motivo que la composición G92, a pesar de ser la que contiene más cantidad de ibuprofeno, es la que presenta menor porcentaje de fármaco liberado, debido a que es la composición más hidrófoba. Sin embargo, las composiciones G37 y G60 al presentar un mayor contenido en VI aumenta su hidrofilia, y se incrementa la accesibilidad de las moléculas de agua hacia el enlace éster hidrolizable, siendo en este caso más relevante el contenido de ibuprofeno a la hora de comparar estas dos composiciones, mostrando así la composición G60 un mayor porcentaje de liberación que la G37.

4.5.6 Estudios de biocompatibilidad *in vitro*

Dada la posible aplicación de estos copolímeros derivados de ibuprofeno como biomateriales, un aspecto final muy relevante consiste en la realización de ensayos celulares *in vitro*. Los ensayos que se detallan a continuación fueron realizados usando células HUVECS y siguiendo los procedimientos explicados en el Capítulo 3.

4.5.6.1 Evaluación de citotoxicidad. Ensayo MTT

El ensayo MTT permite la evaluación de la citotoxicidad de los copolímeros preparados asociada a la liberación de componentes tóxicos, productos de degradación o a la presencia de monómero residual que pueden afectar cuantitativa o cualitativamente al desarrollo celular.^{101,102}

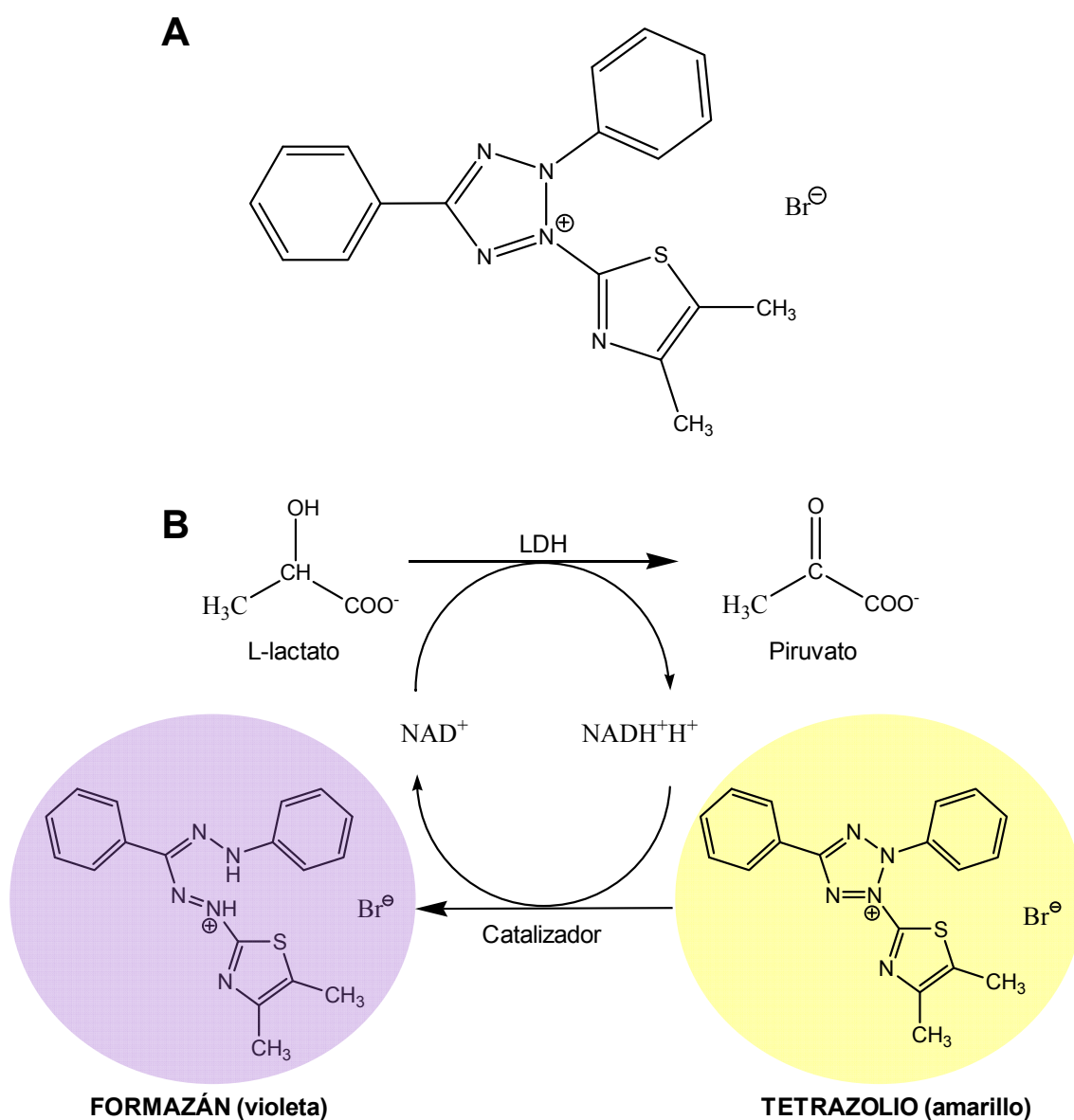


Figura 4.17. (A) Estructura química del reactivo MTT. (B) Esquema de la reacción de reducción de la sal de tetrazolio a formazán.

El ensayo MTT mide la acción de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas sobre la sal de tetrazolio: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio¹⁰³ (Figura 4.17A). La sal es transformada por las enzimas en cristales violetas insolubles en medio acuoso, que absorben a 570 nm una vez disueltos en DMSO (Figura 4.17B). Las enzimas que realizan esta acción sólo se encuentran en células vivas, por lo que el color azul producido es proporcional al número de células vivas presentes.^{101,104-107}

Según el método descrito en el Capítulo 3 (apartado 3.4.7.1) se analiza la viabilidad celular en presencia de los extractos procedentes de los copolímeros en estudio. La Figura 4.18 muestra la viabilidad celular relativa medida sobre los cultivos en contacto con los extractos, observándose en todos los casos y a todos los tiempos una viabilidad superior al 95% y estadísticamente idéntica ($p < 0,05$) a la exhibida por el control negativo TMX, poniendo con ello de manifiesto la ausencia de citotoxicidad de estos sistemas derivados de ibuprofeno con este tipo celular.

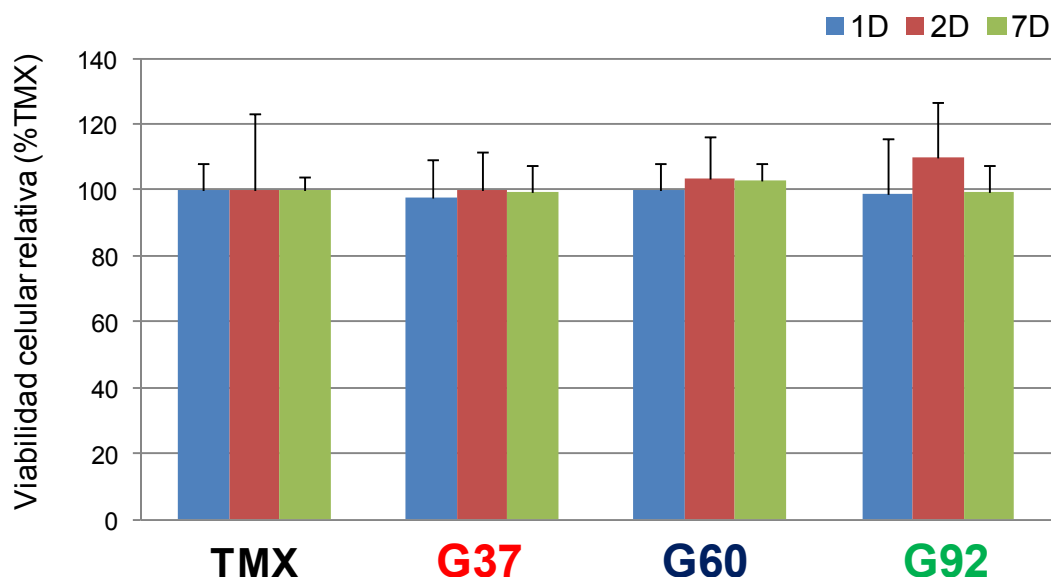


Figura 4.18. Resultados de citotoxicidad del ensayo MTT de la muestra control (TMX) y los copolímeros *p*(HEI-co-VI) a 1, 2 y 7 días de estudio. Se representa la media \pm error estándar de la media ($n=16$).

4.5.6.2 Evaluación de la adhesión y proliferación celular. Ensayo Alamar Blue

Los procesos de adhesión y proliferación celular sobre un polímero dependen en gran medida de las características de superficie del material, tales como el grado de hidrofobicidad, la carga, la energía libre de superficie y la topografía.¹⁰⁸

Este ensayo tiene como objetivo cuantificar la proliferación celular sobre la superficie de los polímeros cuando la siembra se realiza directamente sobre la superficie de los mismos. Al igual que los ensayos basados en el empleo de sales del tetrazolio, este método valora la reducción química del ambiente celular.

El reactivo Alamar Blue es un indicador rédox que responde a la reducción u oxidación del medio¹⁰⁹⁻¹¹¹ utilizado para la cuantificación colorimétrica de la actividad celular, la cual se relaciona con los niveles de especies reducidas presentes en el medio como son NADPH, FADH, etc., que pueden a su vez reducir diversos compuestos como las sales de tetrazolio o el reactivo Alamar Blue. Este proceso puede ser cuantificado debido a que se produce fluorescencia y cambio de color en respuesta a la reducción química del medio.¹¹² El reactivo Alamar Blue es soluble y estable en el medio de cultivo, no es tóxico y no afecta ni a la viabilidad ni a la proliferación celular. Estas características permiten adicionarlo al medio de cultivo y retirarlo repetidas veces, realizando diferentes mediciones con el fin de estudiar la proliferación celular con el tiempo.¹¹³

Siguiendo el procedimiento experimental descrito en el Capítulo 3 (apartado 3.4.7.2) se cultivan las células HUVECS directamente sobre la superficie de los distintos materiales durante un periodo de 21 días,

adicionando el reactivo Alamar Blue y realizando lecturas colorimétricas a 1, 4, 7, 14 y 21 días con el fin de estudiar la evolución temporal del cultivo.

La Figura 4.19 muestra los niveles de proliferación celular sobre los sistemas p(HEI-co-VI) y sobre el control TMX. En todas las composiciones poliméricas la tendencia en la adhesión y proliferación es similar a la del material control TMX. Todos los materiales estudiados muestran un incremento en el número de células entre 1 y 7 días, aunque significativamente inferior al del TMX ($p < 0,001$). Las composiciones H37 y H60 presentan valores más próximos a los obtenidos para el TMX a lo largo de los distintos tiempos de estudio. Sin embargo, para la composición H92 se aprecia una tendencia general de adhesión inferior a las otras dos composiciones en estudio, debido posiblemente al mayor carácter hidrófobo de este material, tal y como se ha comprobado con los resultados de las medidas del ángulo de contacto sobre las superficies de los materiales, debido a su mayor contenido en el monómero HEI. Según bibliografía, varios autores consideran que tanto superficies muy hidrofóbicas como muy hidrofílicas no son propicias para la adhesión y crecimiento celular, siendo valores intermedios (valores de ángulo de contacto próximos a 50°) los mejores para promover la adhesión celular.¹¹⁴

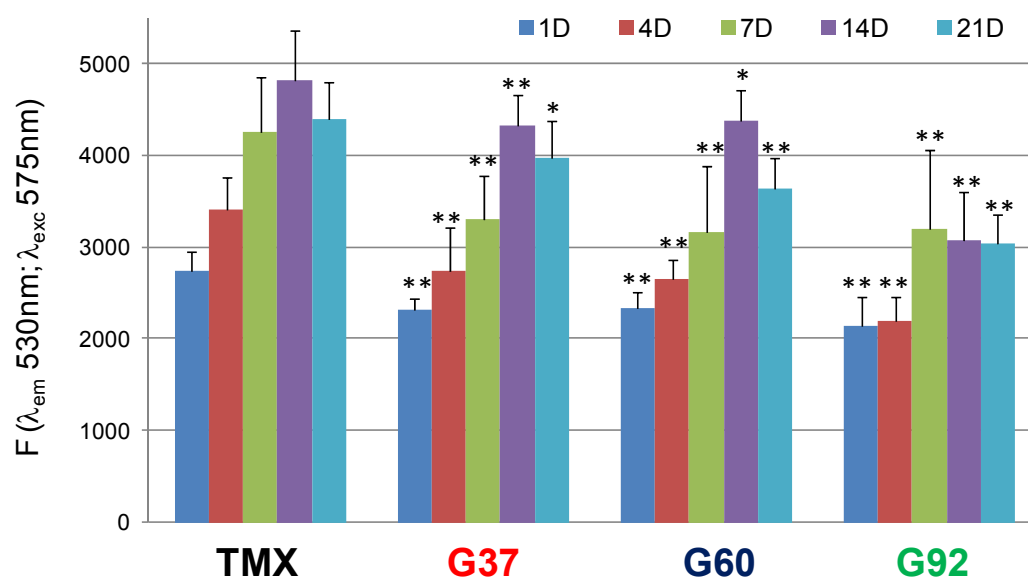


Figura 4.19. Resultados del ensayo Alamar Blue de la muestra control (TMX) y los copolímeros *p*(HEI-co-VI) a 1, 2, 7, 14 y 21 días de estudio. Se representa la media \pm error estándar de la media ($n=16$) y las diferencias significativas obtenidas en los ANOVA frente al TMX (*: $p<0,01$: ** $p<0,001$).

Los resultados obtenidos en los ensayos celulares realizados indican que los copolímeros derivados de ibuprofeno y VI preparados en este trabajo presentan una elevada biocompatibilidad y una superficie adecuada para la adhesión y crecimiento de células.

4.6 BIBLIOGRAFÍA

¹ Alencar de Queiroz, A.A.; Gallardo, A.; San Román, J. *Biomaterials*, **2000**, *21*, 1631-1643.

² Odian G. *Principles of Polymerization*. 4^a ed. Wiley Interscience. **2004**. Nueva Jersey.

- ³ Mayo, F.R.; Lewis, F.M. *Journal of the American Chemical Society*, **1944**, *66*, 1594-1601.
- ⁴ Fukuda, T.; Kubo, K.; Ma, Y.D. *Progress in Polymer Science*, **1992**, *17*, 875-916.
- ⁵ Szymanski, R. *Progress in Polymer Science*, **1992**, *17*, 917-951.
- ⁶ Fineman, M.; Ross, S.D. *Journal of Polymer Science*, **1950**, *5*, 259-262.
- ⁷ Kelen, T.; Tudos, F. *Journal of Macromolecular Chemistry*, **1975**, *A9*, 1-27.
- ⁸ Tidwell, P.W.; Mortimer, G.A. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, **1965**, *3*, 369-387.
- ⁹ Behnken, D.W. *Journal of Polymer Science Part A: General Papers*, **1964**, *2*, 645-668.
- ¹⁰ Patino-Leal, H.; Reilly, P.M.; O'Driscoll, K.F. *Journal of Polymer Science, Polymer Letters*, **1980**, *18*, 219-227.
- ¹¹ Kruse, R.L. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters*, **1967**, *5*, 437-440.
- ¹² Mao, R.; Huglin, M.B. *Polymer*, **1993**, *34*, 1709-1715.
- ¹³ Mao, R.; Huglin, M.B. *Polymer*, **1994**, *35*, 3525-3529.
- ¹⁴ Aguilar, M.R.; Gallardo, A.; Fernández, M.M.; San Román, J. *Macromolecules*, **2002**, *35*, 2036-2041.
- ¹⁵ Beginn, U. *Colloid and Polymer Science*, **2008**, *286*, 1465-1474.
- ¹⁶ Zaremski, M.Y.; Kalugin, D.I.; Golubev, V.B. *Polymer Science (Series B)*, **2011**, *53*, 307-312.

- ¹⁷ IUPAC-Pure and Applied Chemistry, **1996**, *68*, 2287-311.
- ¹⁸ Kim, J.; Gray, M.K.; Zhou, H.; Nguyen, S.T.; Torkelson, J.M. *Macromolecules*, **2005**, *38*, 1037-1040.
- ¹⁹ Tao, Y.; Kim, J.; Torkelson, J.M. *Polymer*, **2006**, *47*, 6773-6781.
- ²⁰ Mok, M.M.; Kim, J.; Torkelson, J.M. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, **2007**, *46*, 48-58.
- ²¹ Kim, J.; Zhou, H.; Nguyen, S.T.; Torkelson, J.M. *Polymer*, **2006**, *47*, 5799-5809.
- ²² Lecolley, F.; Tao, L.; Mantovani, G.; Durkin, I.; Lautru, S.; Haddleton, D.M. *Chemical Communications*, **2004**, *10*, 2026-2027.
- ²³ Funhoff, A.M.; Monge, S.; Teeuwen, R.; Koning, G.A.; Schuurmans-Nieuwenbroek, N.M.E.; Crommelin, D.J.A.; Haddleton, D.M.; Hennink, W.E.; van Nostrum, C.F. *Journal of Controlled Release*, **2005**, *102*, 711-724.
- ²⁴ Bougard, F.; Jeusette, M.; Mespouille, L.; Dubois, P.; Lazzaroni, R. *Langmuir*, **2007**, *23*, 2339-2345.
- ²⁵ Milonaki, Y.; Kditi, E.; Pispas, S.; Demetzos, C. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, **2012**, *50*, 1226-1237.
- ²⁶ Davis, K.A.; Matyjaszewski, K. *Advances in Polymer Science*, **2002**, *159*, 1-169.
- ²⁷ Matyjaszewski K. *Controlled/Living Radical Polymerization: Progress in ATRP, NMP, and RAFT*. American Chemical Society. **2000**. Washinton D.C.
- ²⁸ Matyjaszewski K. *Advances in Controlled/Living Radical Polymerization*. American Chemical Society. **2003**. Washinton D.C.

- ²⁹ Gao, C.; Xing, J. *Soft Matter*, **2009**, *5*, 4788-4796.
- ³⁰ Xiong, Q. *Australian Journal of Chemistry*, **2009**, *62*, 1371-1377.
- ³¹ Yin, M.; Ding K.; Gropeanu, R.; Shen, J.; Berger, R.; Weil, T.; Mullen, K. *Biomacromolecules*, **2008**, *9*, 3231-3238.
- ³² Matyjaszewski, K.; Ziegler, M.J.; Arehart, S.V.; Greszta, D.; Pakula, T. *Journal of Physical Organic Chemistry*, **2000**, *13*, 775-786
- ³³ Matyjaszewski, K.; Xia, J. *Chemical Reviews*, **2001**, *101*, 2921-2990.
- ³⁴ Lee, S.B.; Russell, A.J.; Matyjaszewski, K. *Biomacromolecules*, **2003**, *4*, 1386-1393.
- ³⁵ Paris, R.; De la Fuente, J. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, **2007**, *45*, 1845-1855.
- ³⁶ Inoue, Y.; Watanabe, J.; Takai, M.; Yusa, S.; Ishihara, K. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, **2005**, *43*, 6073-6083.
- ³⁷ Sun, X.; Luo, Y.; Wang, R.; Li, B.G.; Liu, B.; Zhu, S. *Macromolecules*, **2007**, *40*, 849-859.
- ³⁸ Karaky, K.; Billon, L.; Pouchan, C.; Desbriere, J. *Macromolecules*, **2007**, *40*, 458-464.
- ³⁹ Lefay, C.; Charleux, B.; Save, M.; Chassenieux, C.; Guerret, O.; Magne, S. *Polymer*, **2006**, *47*, 1935-1945.
- ⁴⁰ Wong, C.; Kim, J.; Roth, C.; Torkelson, J. *Macromolecules*, **2007**, *40*, 5631-5633.
- ⁴¹ Sardelis, K.; Michels, H.J.; Allen, G. *Polymer*, **1984**, *25*, 1011-1019.

- ⁴² Okabe, S.; Seno, K.; Kanaoka, S.; Aoshima, S.; Shibayama, M. *Macromolecules*, **2006**, *39*, 1592-1597.
- ⁴³ Lefebvre, M.; Dettmer, C.; McSwain, R.; Xu, C.; Davila, J.; Composto, R.; Nguyen, S.; Shull, K. *Macromolecules*, **2005**, *38*, 10494-10502.
- ⁴⁴ Dettmer, C.M.; Gray, M.K.; Torkelson, J.M.; Nguyen, S.T. *Macromolecules*, **2004**, *37*, 5504-5512.
- ⁴⁵ Mok, M.M.; Kim, J.; Torkelson, J.M. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, **2008**, *46*, 48-58.
- ⁴⁶ Brar, A.S.; Saini, T. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, **2005**, *43*, 2810-2825.
- ⁴⁷ Huijser, S.; Mooiweer, G.D.; Van der Hofstad, R.; Staal, B.B.P.; Feenstra, J.; Van Herk, A.M.; Koning, C.E.; Duchateau, R. *Macromolecules*, **2012**, *45*, 4500-4510.
- ⁴⁸ Mok, M.M.; Ellison, C.J.; Torkelson, J.M. *Macromolecules*, **2011**, *44*, 6220-6226.
- ⁴⁹ Van Steenberge, P.H.M.; D'hooge, D.R.; Wang, Y.; Zhong, M.; Reyniers, M.F.; Konkolewicz, D.; Matyjaszewski, K.; Marin, G.B. *Macromolecules*, **2012**, *45*, 8519-8531.
- ⁵⁰ Ziegler, M.J.; Matyjaszewski, K. *Macromolecules*, **2001**, *34*, 415-424.
- ⁵¹ De la Fuente, J.L.; Cañamero, P.F.; Fernández-García, M. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, **2006**, *44*, 1807-1816.
- ⁵² García-Fernández, L.; Aguilar, M.R.; Fernández, M.M.; Lozano, R.M.; Giménez, G.; Valverde, S.; San Román, J. *Biomacromolecules*, **2010**, *11*, 1763-1772.

- ⁵³ Lopez-Donaire, M.L; Sussman, E.M.; Fernandez-Gutierrez, M.; Mendez-Vilas, A.; Ratner, B.D.; Vazquez-Lasa, V.; San Roman, J. *Biomacromolecules*, **2012**, *13*, 624-635.
- ⁵⁴ López-Donaire, M.L.; Parra-Cáceres, J.; Vázquez-Lasa, B.; García-Álvarez, I.; Fernández-Mayoralas, A.; López-Bravo, A.; San Román, J. *Biomaterials*, **2009**, *30*, 1613-1626.
- ⁵⁵ Hurtgen, M.; Debuigne, A.; Fustin, C.A.; Jerome, C.; Detrembleurs, C. *Macromolecules*, **2011**, *44*, 4623-4631.
- ⁵⁶ Sanchez-Chaves, M.; Martinez, G.; Lopez-Madruga, E.; Fernandez-Monreal, C. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, **2002**, *40*, 1192-1199.
- ⁵⁷ Pekel, N.; Ahiner, N.; Guven, O. Rzaev, Z.M.O. *European Polymer Journal*, **2001**, *37*, 2443-2451.
- ⁵⁸ Bailly, N.; Thomas, M.; Klumperman, B. *Biomacromolecules*, **2012**, *10*, 4109-4117.
- ⁵⁹ Shantha, K.L.; Harding, D.R.K. *International Journal of Pharmaceutics*, **2000**, *207*, 65-70.
- ⁶⁰ Hoffman, A.S. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2012**, *64*, 18-23.
- ⁶¹ Sarvanan, S.; Selvan, P.S.; Gopal, N.; Gupta, J.K; De, B. *Archiv der Pharmazie*, **2005**, *338*, 488-492.
- ⁶² Thakur, V.; Prashar, B.; Arora, S. *Drug Invention Today*, **2012**, *4*, 414-419.

- ⁶³ Banfi, E.; Scialino, G.; Zampieri, D.; Mamolo, M.G.; Vio, L.; Ferrone, M.; Fermeiglia, M.; Paneni, M.S.; Pricl, S. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2006**, *58*, 76-84.
- ⁶⁴ Sun, N.; Xie, Y.; Sheng, C.; Cao, Y.; Zhang, W.; Chen, H.; Fan, G. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **2013**, *41*, 229-235.
- ⁶⁵ Apostolidis, I.; Liaras, K.; Geronikaki, A.; Hadjipavlou-Litina, D.; Gavalas, A.; Soković, M.; Glamočlija, J.; Ćirić, A. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2013**, *21*, 532-539.
- ⁶⁶ Beggs, W.H.; Andrews, F.A.; Sarosi, G.A. *Life Sciences*, **1981**, *28*, 111-118.
- ⁶⁷ Yu, S.; Wu, G.; Gu, X.; Wang, J.; Wang, Y.; Gao, H.; Ma, J. *Journal of Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2013**, *103*, 15-22.
- ⁶⁸ Gao, G.H.; Park, M.J.; Li, Y.; Im, G.H.; Kim, J.H.; Kim, H.N.; Lee, J.W.; Jeon, P.; Bang, O.Y.; Lee, J.H.; Lee, D.S. *Biomaterials*, **2012**, *33*, 9157-9164.
- ⁶⁹ Duan, S.Y.; Ge, X.M.; Lu, N.; Wu, F.; Yuan, W.; Jin, T. *International Journal of Nanomedicine*, **2012**, *7*, 3813-3822.
- ⁷⁰ Yin, H.; Lee, E.S.; Kim, D.; Lee, K.H.; Oh, K.T.; Bae, Y.H. *Journal of Controlled Release*, **2008**, *126*, 130-138.
- ⁷¹ Oh, K.T.; Lee, E.S.; Kim, D.; Bae, Y.H. *International Journal of Pharmaceutics*, **2008**, *358*, 177-183.
- ⁷² Fares, M.M.; Al-Shboul, A.M. *Journal of biomedical materials research, Part A*, **2012**, *100A*, 863-871.
- ⁷³ Lo, C.L.; Lin, S.J.; Tsai, H.C.; Chan, W.H.; Tsai, C.H.; Cheng, C.H.D.; Hsiue, G.H. *Biomaterials*, **2009**, *30*, 3961-3970.

- ⁷⁴ Velasco, D.; Réthoré, G.; Newland, B.; Parra, J.; Elvira, C.; Pandit, A.; Rojo, L.; San Román, J. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2012**, *82*, 465-474.
- ⁷⁵ Sahiner, N.; Ozay, O. *Reactive & Functional Polymers*, **2011**, *71*, 607-615.
- ⁷⁶ Nan, Y.; Yuan, L.; Xu, C.B.; Nan, S.J.; Niu, Y. *Acta Crystallographica Section E*, **2010**, *66*, m1518.
- ⁷⁷ Wang, Z.L.; Li, M.X. *Acta Crystallographica, Section C, Crystal Structure Communications*, **2010**, *C66*, m311-m313.
- ⁷⁸ Han, F.; Shi, H.; Gao, Y.; Ma, H. *Acta Crystallographica*, **2010**, *E66*, m943-m944.
- ⁷⁹ Xiao, Z.; Zhan, D. *Acta Crystallographica*, **2010**, *E66*, m1040-m1041.
- ⁸⁰ Kruglova, V.A.; Annenkov, V.V.; Goncharov, N.N.; Danilovtseva, E.N. *Journal of Analytical Chemistry*, **2010**, *65*, 793-797.
- ⁸¹ Pekel, N.; Güven, O. *Polymer Bulletin*, **2004**, *51*, 307-314.
- ⁸² Takafuji, M.; Ide, S.; Ihara, H.; Xu, Z. *Chemistry Materials*, **2004**, *16*, 1977-1983.
- ⁸³ Kara, A.; Uzun, L.; Besirli, N.; Denizli, A. *Journal of Hazardous Materials*, **2004**, *106B*, 93-99.
- ⁸⁴ Uguzdogan, E.; Denkbaz, E.B.; Ozturk, E.; Tuncel, S.A.; Kabasakal, O.S. *Journal of Hazardous Materials*, **2009**, *162*, 1073-1080.
- ⁸⁵ Uguzdogan, E.; Denkbaz, E.B.; Kabasakal, O.S. *Journal of Hazardous Materials*, **2010**, *177*, 119-125.

- ⁸⁶ Andersson, M.; Hansson, O.; Ohrstrom, L.; Idstrom, A.; Nyden, M. *Colloid and Polymer Science*, **2011**, *289*, 1361-1372.
- ⁸⁷ Parejo, C.; Gallardo, A.; San Román, J. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **1998**, *9*, 803-809.
- ⁸⁸ Smith, B.M.; March, J. *March's Advanced Organic Chemistry*. 5^a Ed. John Wiley and Sons. **2001**. New York.
- ⁸⁹ Neises, B.; Steglich, W. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **1978**, *17*, 522-524.
- ⁹⁰ Hassner, A.; Alexanian, V. *Tetrahedron Letters*, **1978**, 4475-4478.
- ⁹¹ Hoefle, G.; Steglich, W. *Synthesis*, **1972**, 619-621.
- ⁹² Bamford, C.H.; Schofield, E. *Polymer*, **1981**, *22*, 1227-1235.
- ⁹³ Pekel, N.; Rzaev, Z.; Güven, O. *Macromolecular Chemistry and Physics*, **2004**, *205*, 1088-1095.
- ⁹⁴ Mikhaleva, A.I. *European Polymer Journal*, **2004**, *40*, 1027-1032.
- ⁹⁵ Fox, T. G. *Bulletin of American Physical Society*, **1956**, *1*, 123-130.
- ⁹⁶ Molina, R.; Vilchez, A.; Canal, C.; Esquena, J. *Surface and Interface Analysis*, **2009**, *41*, 371-377.
- ⁹⁷ Xu, L.C.; Siedlecki, C.A. *Biomaterials*, **2007**, *28*, 3273-3283.
- ⁹⁸ Wise, D.L.; Trantolo, D.J.; Altobelli, D.E.; Yaszemski, M.J.; Gresser, J.D.; Schwartz, E.R. *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, Part A: Materials*. Marcel Dekker. **1995**. New York.

- ⁹⁹ Gallardo, A.; Rodriguez, G.; Fernandez, M.; Aguilar, M.R.; Roman, J.S. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, **2004**, *15*, 917-928.
- ¹⁰⁰ Harker, L.A.; Kelly A. B.; Hanson S.R. *Circulation*, **1991**, *83*, 41-55.
- ¹⁰¹ Almeida, T.; Leite Ferreira, B.J.M.; Loureiro, J.; Correia, R.N.; Santos, C. *Materials Science and Engineering (C)*, **2011**, *31*, 658-662.
- ¹⁰² Niu, Q.X.; Zhao, C.Y.; Jing, Z.A. *Journal of Immunological Methods*, **2001**, *251*, 11-19.
- ¹⁰³ Mosmann, T. *Journal of Immunological Methods*, **1983**, *65*, 55-63.
- ¹⁰⁴ Wan, H.; Williams, R.; Doherty, P.; Williams, D.F. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **1994**, *5*, 154-159.
- ¹⁰⁵ Wang, X.; Li, S.; Cao, T.; Fu, X.; Yu, G. *Toxicology in Vitro*, **2012**, *26*, 1056-1063.
- ¹⁰⁶ Liu, Y. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **1999**, *23*, 377-395.
- ¹⁰⁷ Yoshii, E. *Journal of Biomedical Materials Research*, **1997**, *37*, 517-524.
- ¹⁰⁸ Jung, D.R.; Kapur, R.; Adams, T.; Giuliano, K.A.; Mrksich, M.; Craighead, H.G.; Taylor, D.L. *Critical Reviews in Biotechnology*, **2001**, *21*, 111-154.
- ¹⁰⁹ Deng, C.; Xiao, X.; Yao, N.; Yang, X.B.; Weng, J. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, **2012**, *60*, 969-978.
- ¹¹⁰ Nakayama, G.R.; Caton, M.C.; Nova, M.P.; Parandoosh, Z. *Journal of Immunological Methods*, **1997**, *204*, 205-208.

¹¹¹ Nikolaychik, V.V.; Samet, M.M.; Lelkes, P.I. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, **1996**, 7, 181-191.

¹¹² Nociari, M.M.; Shalev, A.; Benias, P.; Russo, C. *Journal of Immunological Methods*, **1998**, 213, 157-167.

¹¹³ Gloeckner, H.; Jonuleit, T.; Lemke, H.D. *Journal of Immunological Methods*, **2001**, 252, 131-138.

¹¹⁴ Ma, Z.; Mao, Z.; Gao, C. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2007**, 60, 137-157.

Capítulo 5

*OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS
BIOACTIVAS A PARTIR DE
COPOLÍMEROS DE GRADIENTE
DERIVADOS DE IBUPROFENO Y
1-VINILIMIDAZOL*

5.1 INTRODUCCIÓN

Uno de los principales inconvenientes de gran parte de los fármacos aplicados de manera sistémica es la necesidad de administración en altas dosis, lo que en algunos casos puede provocar efectos tóxicos asociados a la falta de especificidad y distribución indiscriminada por todo el organismo. Es por este motivo que numerosas investigaciones se han centrado en el desarrollo de nuevas formulaciones que mejoren la eficacia y disminuyan la toxicidad de los fármacos. Es en este entorno en el que surge la nanotecnología, que aplicada en el campo de la medicina, se denomina nanomedicina,¹ basada en interacciones entre el cuerpo humano y materiales, estructuras o dispositivos cuyas propiedades se definen a escala nanométrica.²

Una de las principales áreas de trabajo de la nanomedicina³, tal y como se muestra en la Figura 5.1, se centra en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos que mejoren la eficacia de los mismos mediante su incorporación en nanovehículos, los cuales se pueden definir como sistemas complejos de escala nanométrica constituidos por al menos dos componentes, uno de los cuales es el principio activo o molécula biológicamente activa,⁴ y el segundo es el propio sistema que posee una función especial relacionada con el diagnóstico, tratamiento o prevención de una enfermedad. Entre las ventajas que aporta la nanomedicina cabe destacar la mejora de la biodisponibilidad de fármacos garantizando la protección del mismo frente a su degradación tanto física como química (degradación hidrolítica, enzimática, etc.) hasta que alcanzan su lugar de acción. Gracias al pequeño tamaño de estos nanovehículos, y a su elevada superficie específica, presentan una alta interacción con tejidos y fluidos biológicos, logrando una mejor eficacia y menor toxicidad del fármaco administrado, permitiendo además atravesar barreras biológicas como la piel, las mucosas

gastrointestinal o respiratoria, la barrera hematoencefálica e incluso alcanzar compartimentos intracelulares.^{5,6}

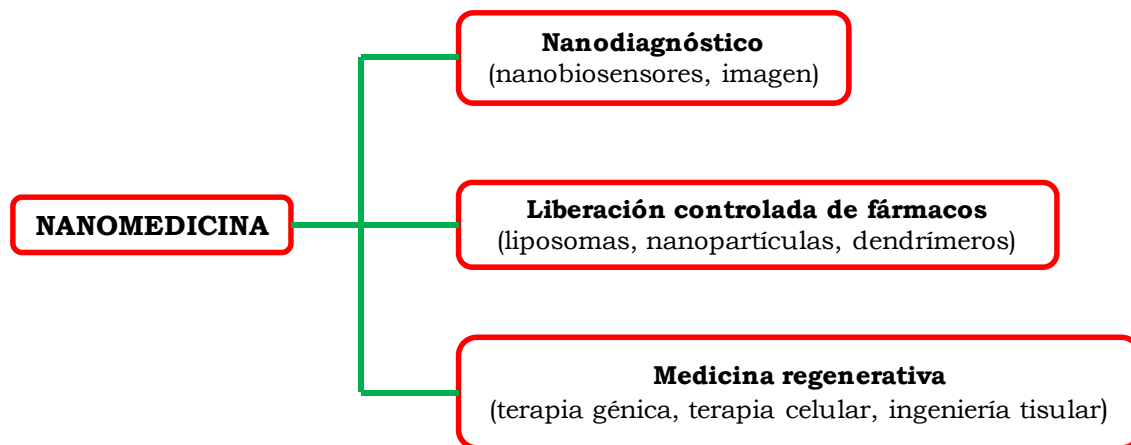


Figura 5.1. Principales áreas de investigación de la nanomedicina.

Los principales sistemas de liberación de fármacos desarrollados en nanomedicina (Figura 5.2) y de los cuales se tienen más resultados son los liposomas,^{7,8} las nano y micropartículas,⁹⁻¹² los dendrímeros,^{13,14} las nanocápsulas¹⁵ y las micelas poliméricas,¹⁶⁻¹⁸ todos ellos sistemas con aplicaciones terapéuticas en campos de enorme relevancia como el cáncer, procesos infecciosos, vacunas, trastornos metabólicos, trastornos autoinmunes, procesos inflamatorios y dolor.¹⁹⁻²³ Actualmente se pueden encontrar sistemas ya aprobados para su utilización en humanos o en fases de ensayos clínicos.²⁴⁻²⁶

A lo largo de la historia de esta nueva disciplina se han cubierto diferentes etapas que van desde la simple encapsulación del principio activo hasta la obtención de sistemas nanométricos multifuncionales que no sólo contienen el principio activo sino también otros elementos que permiten su orientación hacia dianas terapéuticas definidas, visualización del fármaco y seguimiento de su actividad. Un ejemplo es la modificación superficial con ligandos específicos^{27,28} con el fin de conferirles diversas propiedades y

funcionalidades, de forma que pueden ser orientados hacia células diana de forma concreta tras su administración, lo que se traduce en un aumento de la eficacia terapéutica, disminución de efectos secundarios asociados o mejora de la imagen en ciertas situaciones patológicas. Otro ejemplo es la modificación de los sistemas para que puedan responder a estímulos,²⁹⁻³³ como por ejemplo frente a cambios de pH del medio, estímulos bioquímicos, aplicación de calor o de campos magnéticos, de forma que permiten el control del proceso de liberación del principio activo.

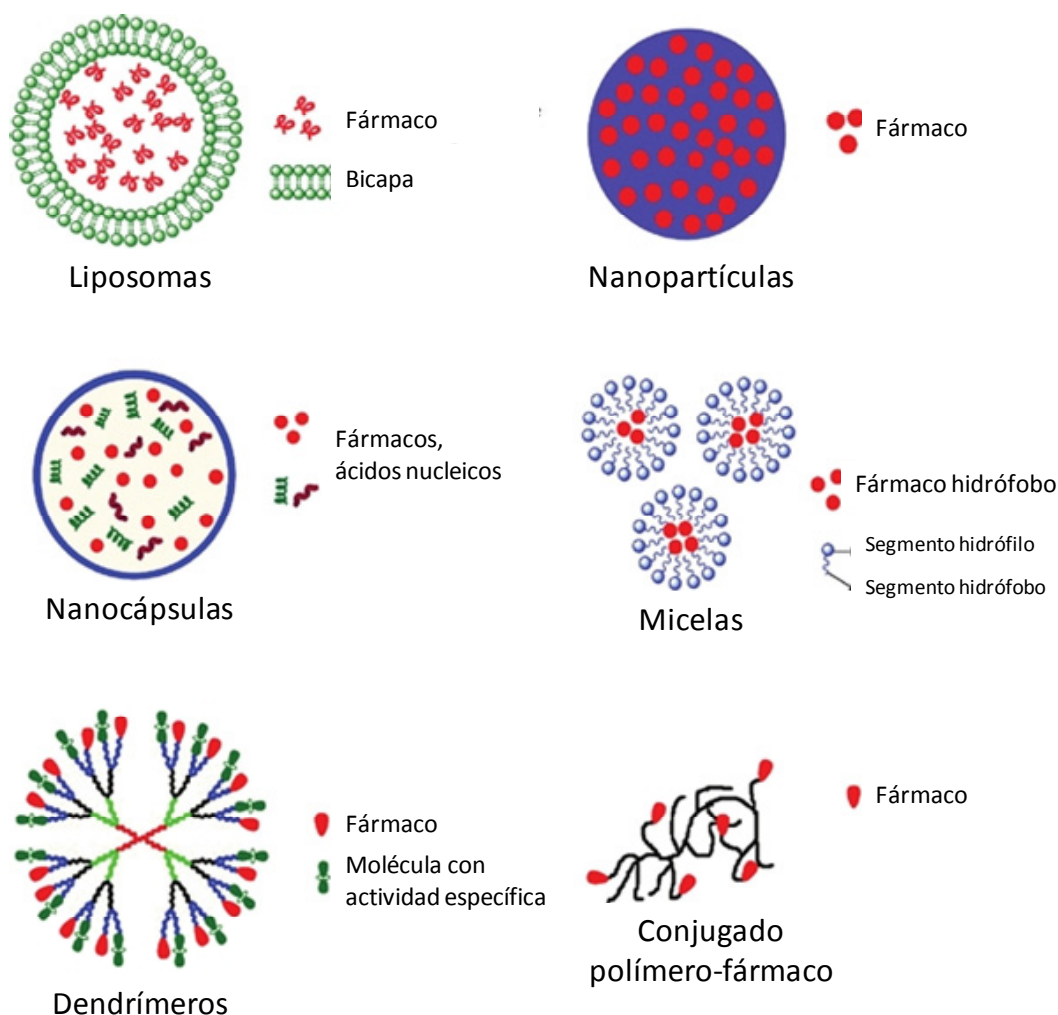


Figura 5.2. *Diferentes nanovehículos propuestos como sistemas de liberación controlada de fármacos.*

- **Micelas poliméricas**

Un reto importante de la nanomedicina y de la liberación de fármacos ha sido el desarrollo de nanovehículos para fármacos poco solubles debido a las múltiples complicaciones que representan, como su baja absorción y biodisponibilidad³⁴ y la posible agregación en sistemas fisiológicos.³⁵ Es en este área en el que se han centrado numerosas investigaciones, y basándose en sistemas coloidales y su capacidad de autoensamblado han desarrollado las micelas poliméricas formadas a partir de copolímeros anfifílicos³⁶ compuestos de segmentos hidrófilos e hidrófobos. Éstos poseen la capacidad de organizarse espontáneamente mediante procesos de autoensamblado³⁷ para formar estructuras o agregados bien definidos y estables a través de interacciones no covalentes, como fuerzas electrostáticas, enlaces de hidrógeno, efecto hidrofóbico, puentes salinos y fuerzas de van der Waals.^{38,39} Así, en las micelas poliméricas formadas en medio acuoso, tal y como vemos en la Figura 5.3, el segmento hidrófobo del copolímero constituye el núcleo de la micela y permite albergar en su interior fármacos hidrófobos con baja solubilidad, ya sea por medio de enlaces covalentes o no covalentes, tales como interacciones hidrófobas e iónicas. El segmento hidrófilo del copolímero forma la cubierta hidrófila de la micela y es el responsable de su estabilidad en el medio fisiológico, permitiendo su circulación y transporte, favoreciendo su dispersión e inhibiendo la interacción y agregación con otros compuestos de naturaleza hidrófoba. De esta forma se consigue incrementar la hidrosolubilidad de fármacos poco solubles, y es por ello que las micelas poliméricas constituyen una de las formas más empleadas actualmente para la liberación de este tipo de fármacos.⁴⁰⁻⁴⁵

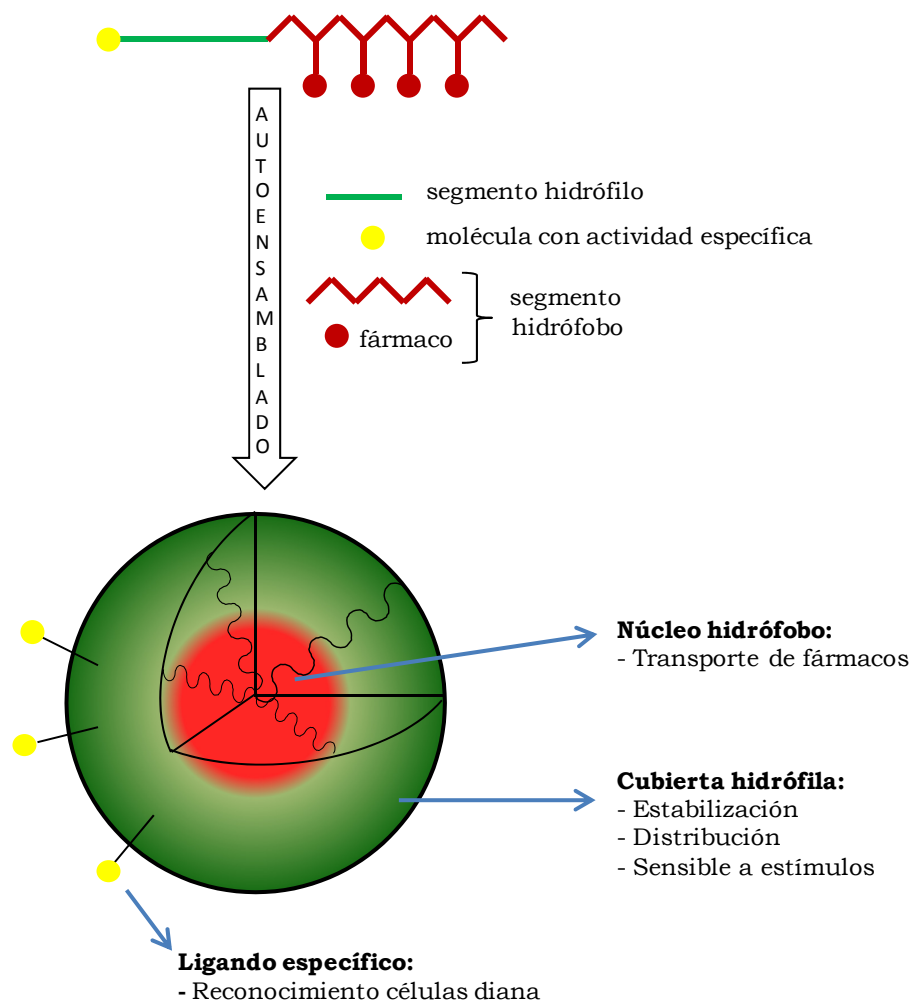


Figura 5.3. Diseño y formación de micelas a partir de copolímeros anfifílicos para el transporte de fármacos poco solubles en medio acuoso.

Las micelas poliméricas se consideran excelentes sistemas para el transporte de fármacos debido a las múltiples ventajas que ofrecen,⁴⁶⁻⁴⁸ como su capacidad para suministrar grandes cargas de fármacos y estabilidad *in vivo* mejorada en comparación con otros portadores coloidales (por ejemplo, los liposomas), debido a su baja concentración micelar crítica que impide su rápida disociación *in vivo*. Gracias a la cubierta de naturaleza hidrófila presentan alta solubilidad así como una baja toxicidad asociada a fármacos poco solubles al encontrarse éstos en el interior de la micela. Su tamaño nanométrico permite su acumulación pasiva en tejidos enfermos como

tumores sólidos mediante el efecto de permeación y retención mejorada. Además su pequeño tamaño es una gran ventaja en los procesos de esterilización de productos farmacéuticos, siendo éste más sencillo y barato en comparación con los necesarios para productos basados en otros tipos de nanovehículos. Además, por medio de ligandos específicos en la superficie de la micela se consigue el reconocimiento selectivo y unión a tejidos o células diana. En las micelas poliméricas el perfil de liberación del fármaco vendrá determinado tanto por las características físico-químicas de los copolímeros que las forman (microestructura, longitud de las cadenas, tipo de interacción fármaco-polímero), así como de las características de la propia micela, como su tamaño, estabilidad, carga superficial, propiedades de la capa externa, etc., por lo que es posible diseñar sistemas que presenten un perfil de liberación vectorizado, modulado y localizado en el sitio de interés terapéutico.

Para la preparación de micelas poliméricas los trabajos de investigación se han centrado en el uso de copolímeros anfifílicos donde el núcleo hidrófobo está constituido generalmente por polímeros biodegradables, como por ejemplo, poli(ácido láctico) (PLA)^{49,50} o poli(ϵ -caprolactona) (PCL),⁵¹⁻⁵² el cual sirve como reservorio para el fármaco poco soluble protegiéndolo del contacto con el entorno acuoso. Por otro lado, la cubierta de la micela está habitualmente constituida por cadenas de polímeros biocompatibles hidrófilos, como por ejemplo polivinilpirrolidona,⁵³⁻⁵⁴ varios poli(amino ácidos) como el poli(ácido glutámico)⁵⁵ o por PEG,⁵⁶⁻⁵⁹ uno los más utilizados.

Algunos ejemplos que nos encontramos en la literatura sobre la preparación de micelas a partir de copolímeros anfifílicos, son los copolímeros de bloque de poli(óxido de etileno)-b-poli(ácido aspártico) portadores de adriamicina⁶⁰ o copolímeros de bloque de poli(óxido de etileno)-b-poli(ϵ -caprolactona) portadores de paclitaxel⁶¹ y de adriamicina,⁶²

dos fármacos hidrófobos ampliamente utilizados en terapia anticancerosa, los cuales se encuentran anclados covalentemente a la cadena macromolecular. Otros ejemplos son los copolímeros anfífilicos en gradiente de poli(2-metil-2-oxazolina)-grad-poli(2-fenil-2-oxazolina) para la encapsulación de indometacina (medicamento tipo AINEs)⁶³ o micelas poliméricas formadas a partir de copolímeros anfífilicos derivados de quitosano para la encapsulación de ibuprofeno con aplicación en terapia antitumoral.⁶⁴ Recientemente nuestro grupo de investigación ha desarrollado copolímeros anfífilicos en gradiente, como los copolímeros de AB y de VP con el derivado metacrílico del ácido 5-aminonaftalen-2-sulfónico (MANSA) con actividad antiangiogénica,^{65,66} así como copolímeros de VP con el derivado metacrílico del principio activo oleil-2-acetamido-2-deoxi- α -D-glucopiranosido (OAG) con actividad antimitótica,⁶⁷ todos ellos sistemas formadores de micelas poliméricas y que han demostrado ser excelentes candidatos para el tratamiento de procesos cancerígenos.

Como acabamos de ver, la Química Macromolecular ofrece enormes posibilidades a la hora de diseñar este tipo de sistemas nanométricos, así como desarrollar materiales avanzados con características microestructurales específicas que permiten controlar tanto las propiedades físico-químicas como bioquímicas o farmacológicas del material preparado. En el presente capítulo se describe la preparación de nanopartículas bioactivas a partir de los copolímeros p(HEI-co-VI). Tal y como hemos estudiado en el capítulo anterior estos copolímeros presentan un carácter anfífilico debido a la diferente reactividad e hidrofilia del monómero HEI portador de ibuprofeno y del monómero VI, así como por la distribución de las secuencias monoméricas a lo largo de la cadena macromolecular. Estas propiedades permitirán la formación en medio acuoso de micelas poliméricas mediante procesos de autoensamblado, las cuales pueden ser aplicadas como vehículos para la liberación de ibuprofeno de una forma modulada mediante la hidrólisis del fármaco de la cadena polimérica, a la vez de poseer la

capacidad de formar complejos con zinc a través del imidazol, actuando así como potenciales inhibidores de la actividad de las MMP.

5.2 PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS BIOACTIVAS A PARTIR DE COPOLÍMEROS p(HEI-co-VI)

La preparación de nanopartículas se llevó a cabo según el método de nanoprecipitación desarrollado por Fessi y col. y siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 3 (apartado 3.5.1). Este método nos permite preparar nanopartículas a partir de los copolímeros p(HEI-co-VI) G37, G60 y G92, denominándose respectivamente NP37, NP60 y NP92 dependiendo del copolímero de partida. Así, variando sólo los volúmenes de fase acuosa y orgánica, se prepararon varias dispersiones con diferentes concentraciones de nanopartículas (entre 0,05 y 1 mg/ml).

Como puede verse en la Figura 5.4, los copolímeros anfifílicos p(HEI-co-VI) forman estructuras micelares mediante interacciones hidrofóbicas entre los segmentos ricos en HEI, los cuales quedan aislados del medio acuoso al situarse en el interior de la micela, mientras que los segmentos hidrófilos ricos en VI se sitúan en la superficie de las mismas. La asociación de varias micelas conduce a la formación de nanopartículas. Como veremos en los apartados siguientes la disposición y arquitectura macromolecular permiten el diseño de sistemas con propiedades específicas dependientes de la composición polimérica y de las características del medio.

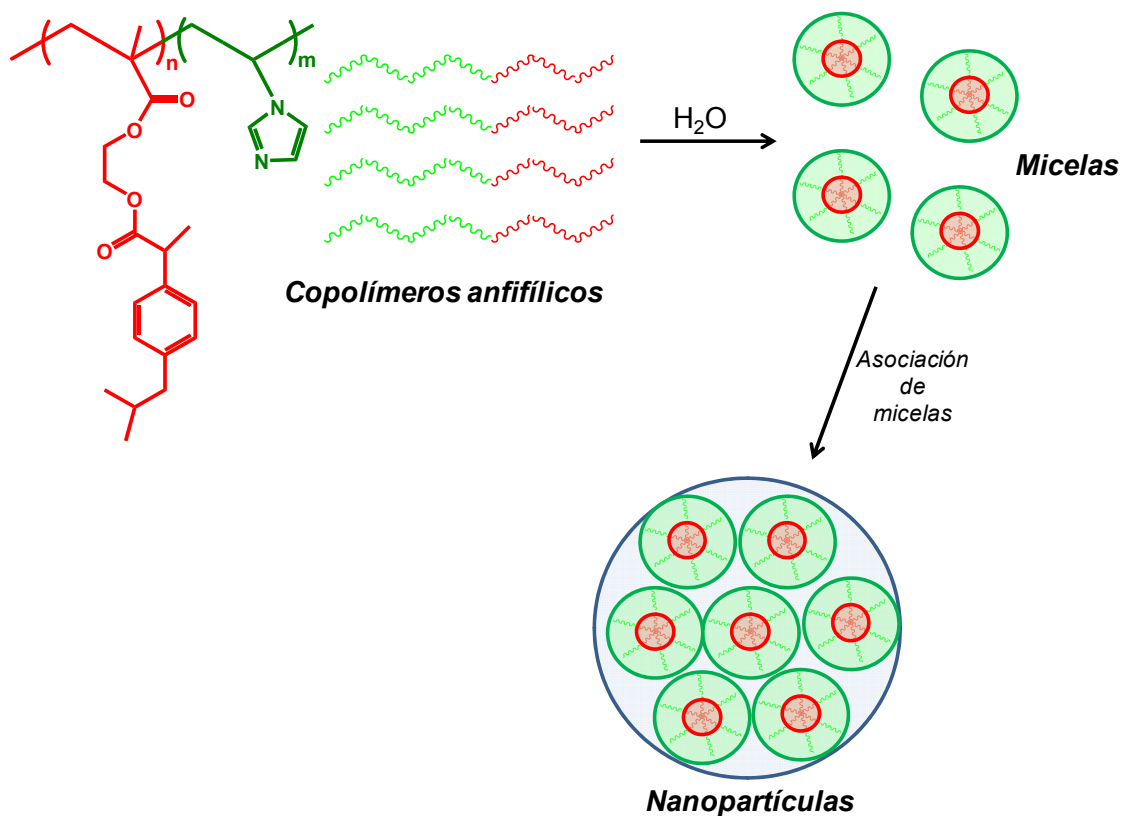


Figura 5.4. Formación de micelas y nanopartículas a partir de copolímeros anfífilicos.

5.3 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS. COMPORTAMIENTO *IN VITRO*

5.3.1 Determinación de la constante de ionización (pK)

Debido a la existencia de un grupo ionizable en el anillo del imidazol (Figura 5.5), es de gran interés el estudio de la capacidad amortiguadora de pH de los sistemas así como la determinación de la constante de ionización (pK) de los mismos, ya que influye en numerosas propiedades. Por ejemplo, en el tamaño, estabilidad, carga superficial, interacción con otros

componentes, liberación del fármaco, etc.⁶⁸ Para ello, se realiza una valoración ácido-base según el procedimiento descrito en el Capítulo 3 (apartado 3.5.2.1).

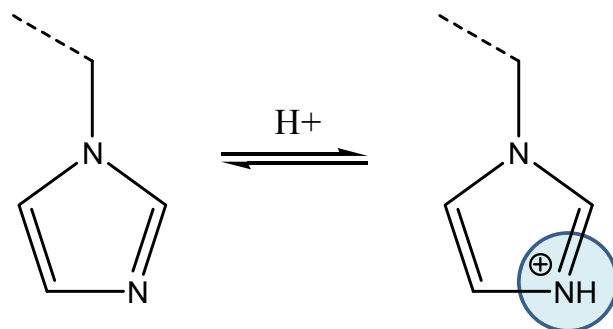


Figura 5.5. Equilibrio ácido-base del imidazol.

Las curvas de valoración obtenidas se muestran en la Figura 5.6, observando claramente la capacidad amortiguadora de pH que aporta el VI, principalmente en la composición en la que se encuentra en mayor proporción (NP37). A partir de las curvas se puede determinar la constante de ionización de cada sistema (Tabla 5.1), observando una clara dependencia con la composición, de forma que al aumentar el contenido en VI en el sistema nanoparticulado, mayor es la capacidad amortiguadora y mayor es el valor del pK. Así, la composición NP37 es la que presenta un valor de pK más alto y más próximo al del homopolímero PVI (pK= 6,1).⁶⁹⁻⁷¹

	pK
NP37	4,2
NP60	3,9
NP92	3,1

Tabla 5.1. Constantes de ionización (pK) obtenidas mediante valoración ácido-base de los sistemas nanoparticulados p(HEI-co-VI).

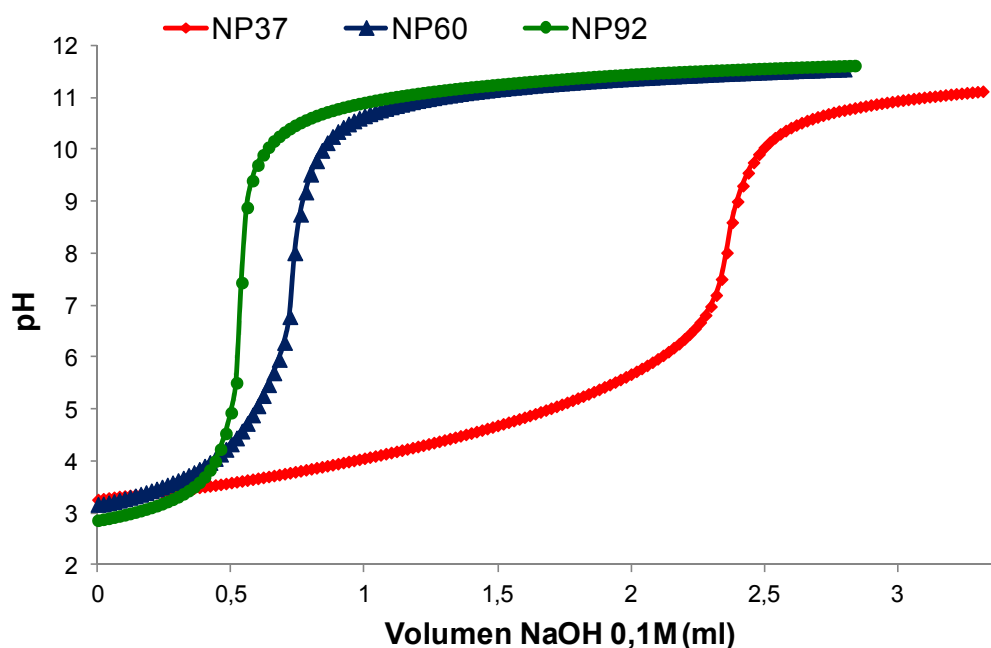


Figura 5.6. Curvas de valoración ácido-base de los sistemas nanoparticulados $p(HEI-co-VI)$.

5.3.2 Propiedades hidrodinámicas superficiales: distribución de tamaño de partícula y potencial zeta. Influencia del pH

Una vez obtenida la dispersión de las nanopartículas poliméricas es importante determinar su tamaño y potencial zeta con el objetivo de analizar su posible aplicación biológica y estabilidad en medios fisiológicos. El tamaño de partícula se determina mediante medidas de DLS mientras que el potencial zeta se calcula a partir de medidas de movilidad electroforética, técnicas explicadas en el Anexo I del presente trabajo.

En la Tabla 5.2 se recogen los resultados obtenidos de las medidas de DLS y potencial zeta de los sistemas NP37, NP60 y NP92 a distintas concentraciones finales de nanopartículas. Estos datos nos muestran que los

copolímeros p(HEI-co-VI) forman estructuras micelares en disolución entre 50 y 200 nm en función de la composición de las mismas, de forma que al aumentar la concentración del monómero HEI (situado en el interior de la micela) se obtienen mayores tamaños de partícula. Además, en todos los casos se observan valores similares de tamaño al variar la concentración de nanopartículas en la suspensión acuosa. Los valores de IP registrados son inferiores a 0,4 lo que nos indica la homogeneidad de tamaño de las partículas preparadas.⁷²

	NP (mg/ml)	D _h (nm)	IP	ζ (mV)	Carga/área
NP37	0,05	58,9 ± 3,6	0,220 ± 0,025	37,2 ± 3,2	0,0034
	0,1	58,6 ± 1,4	0,244 ± 0,008	30,7 ± 1,7	0,0029
	0,4	65,2 ± 2,3	0,380 ± 0,006	32,5 ± 2,1	0,0024
	1,0	66,4 ± 1,7	0,369 ± 0,026	23,4 ± 2,1	0,0017
NP60	0,05	125,2 ± 2,7	0,160 ± 0,006	48,8 ± 3,1	0,0010
	0,1	128,4 ± 2,1	0,154 ± 0,011	43,9 ± 1,3	0,0008
	0,4	136,7 ± 4,1	0,127 ± 0,007	44,2 ± 2,3	0,0008
	1,0	148,3 ± 2,3	0,162 ± 0,007	45,6 ± 2,7	0,0007
NP92	0,05	176,8 ± 4,8	0,122 ± 0,022	49,5 ± 4,8	0,0005
	0,1	177,3 ± 4,2	0,185 ± 0,038	49,6 ± 4,5	0,0005
	0,4	177,7 ± 1,1	0,107 ± 0,017	51,8 ± 2,8	0,0005
	1,0	188,6 ± 3,7	0,121 ± 0,024	52,0 ± 3,1	0,0005

Tabla 5.2. Resultados de Diámetro hidrodinámico (D_h), Índice de polidispersidad (IP), Potencial zeta (ζ) y relación carga/área obtenidos a diferentes concentraciones de nanopartículas p(HEI-co-VI).

La obtención de valores de potencial zeta de signo positivo nos confirma que los grupos imidazol se sitúan en la superficie de la micela formando la corteza hidrófila cargada electrostáticamente (Figura 5.4). Al mismo tiempo,

la magnitud del potencial zeta nos indica que estas micelas son estables en medio acuoso ya que presentan valores superiores a 30 mV en valor absoluto, valor estimado como óptimo para considerar estables a las micelas.⁷³⁻⁷⁷ A la vista de los resultados resalta el hecho de que sea la composición NP92, la de menor contenido en imidazol, la que presenta los mayores valores de potencial zeta. Sin embargo, si tenemos en cuenta el tamaño de las partículas y calculamos la relación carga/área, observamos, como es de esperar, valores mayores para la composición NP37, la de mayor contenido en imidazol. Este valor va disminuyendo con el contenido en VI en el copolímero. Gracias a estos resultados se puede deducir que cuanto mayor es el contenido en VI en el copolímero de partida, menos unidades de VI son necesarias para estabilizar la micela, por lo que, tanto el potencial zeta como el tamaño de las partículas es menor.

	NP (mg/ml)	D_h (nm)	IP	ζ (mV)	Carga/área
NP37	0,1	$60,4 \pm 1,4$	$0,200 \pm 0,012$	$32,7 \pm 1,2$	0,0029
	0,4	$62,5 \pm 1,8$	$0,310 \pm 0,019$	$29,9 \pm 2,3$	0,0024
NP60	0,1	$117,4 \pm 1,8$	$0,131 \pm 0,015$	$41,9 \pm 1,8$	0,0010
	0,4	$130,7 \pm 2,1$	$0,157 \pm 0,011$	$40,2 \pm 2,5$	0,0007
NP92	0,1	$168,8 \pm 2,8$	$0,125 \pm 0,021$	$49,3 \pm 3,2$	0,0006
	0,4	$188,7 \pm 2,1$	$0,131 \pm 0,027$	$51,2 \pm 2,6$	0,0005

Tabla 5.3. Resultados de Diámetro hidrodinámico (D_h), Índice de polidispersidad (IP), Potencial zeta (ζ) y relación carga/área obtenidos a diferentes concentraciones de nanopartículas p(HEI-co-VI) medidos tres meses después de su preparación.

Es importante destacar el hecho de que al repetir las medidas de tamaño y potencial zeta de las dispersiones tres meses después de su fecha de preparación se obtuvieron resultados muy similares a los iniciales (Tabla

5.3), lo que pone de manifiesto la gran estabilidad de estos sistemas nanoparticulados.

• Influencia del pH

La presencia de carga positiva en la superficie de las micelas dependerá del pH del medio, ya que como hemos visto en el apartado anterior influye en el grado de protonación del anillo imidazol. Por lo tanto, es importante hacer un estudio del tamaño y carga de las nanopartículas a diferentes valores de pH, que como es de esperar, tiene un efecto directo sobre la estabilidad de las mismas.

En la siguiente Tabla 5.4 se muestran los resultados de tamaño y potencial zeta obtenidos de las dispersiones de nanopartículas NP37, NP60 y NP92 a una concentración de 0,4 mg/ml al ir variando el pH del medio. Para las tres composiciones p(HEI-co-VI) se observa claramente cómo al aumentar el pH del medio el tamaño de las partículas aumenta, advirtiéndose al mismo tiempo y en todos los casos el descenso del potencial zeta como consecuencia de la desprotonación del imidazol.

	$D_h (nm) / \zeta (mV)$				
	pH= 3	pH= 4	pH= 5	pH= 6	pH= 7
NP37	61,1/29,9	56,3/29,9	96,5/26,1	125,0/16,7	145,1/7,5
NP60	148,3/33,1	138,7/35,0	144,8/27,5	164,4/21,4	308,0/10,5
NP92	161,9/45,8	163,4/43,8	205,8/34,7	216,0/29,8	349,0/18,2

Tabla 5.4. Resultados de Diámetro hidrodinámico (D_h) y Potencial zeta (ζ) obtenidos para los sistemas nanoparticulados p(HEI-co-VI) a diferentes valores de pH en medio salino (100 mM NaCl).

Tal y como vemos representado en la Figura 5.7, a pH inferiores al pK el imidazol se encuentra cargado positivamente, por lo que la repulsión entre las partículas favorece la estabilidad de las mismas. Sin embargo, al ir aumentando el pH del medio el imidazol se va desprotonando, por lo que la carga de la partícula disminuye, y por tanto disminuye la repulsión entre partículas y se agregan. El valor de pH a partir del cual tiene lugar la agregación de las partículas dependerá de la composición de las mismas. Así, es la composición NP90, cuyo valor de pK es inferior al de las otras composiciones, la que experimenta antes dicho fenómeno. Esta relación entre el tamaño y carga de las micelas poliméricas con el pH del medio ya ha sido descrita previamente por otros autores al estudiar este comportamiento en micelas en las que el grupo imidazol forma parte de su composición.^{78,79}

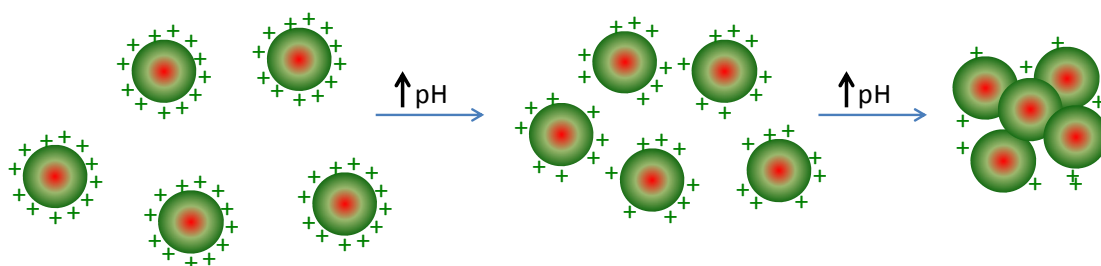


Figura 5.7. Representación del fenómeno de agregación de nanopartículas al aumentar el pH del medio.

La agregación de las partículas a determinados valores de pH se puede evitar mediante la adición de un surfactante. Así, usando como fase acuosa una disolución de PVA al 1% (p/V) se consigue evitar la agregación, lo cual se comprobó mediante medidas de DLS, obteniendo tamaños de partícula similares a los conseguidos sin la ayuda de dicho surfactante, independientemente del valor del pH del medio (Tabla 5.5). Estos resultados son muy importantes ya que se comprueba que gracias a la adición del surfactante es posible el mantenimiento de la estabilidad de la suspensión

de nanopartículas en medios con valores de pH altos, como por ejemplo en los utilizados a la hora de realizar los estudios de liberación del fármaco o en los ensayos celulares, tal y como se expondrá en siguientes apartados.

		D_h (nm)	
		pH < pK	pH > pK
NP37	Agua	61,1 ± 1,0	145,1 ± 1,0
	PVA 1%	100,5 ± 1,5	109,0 ± 1,7
NP60	Agua	148,3 ± 1,7	308,0 ± 1,0
	PVA 1%	101, 9 ± 3,0	111,0 ± 3,8
NP92	Agua	161,9 ± 1,7	349,0 ± 1,0
	PVA 1%	155,5 ± 7,0	153,0 ± 6,8

Tabla 5.5. Resultados de Diámetro hidrodinámico (D_h) obtenidos para los sistemas nanoparticulados p(HEI-co-VI) preparados en agua y en PVA 1% (p/V) a diferentes valores de pH.

5.3.3 Examen morfológico y de tamaño mediante microscopía electrónica (SEM y TEM)

Una vez obtenida la dispersión de nanopartículas y siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 3 (apartado 3.5.2.3), se comprueba la obtención de las mismas así como su morfología y tamaño mediante SEM y TEM.

En las Figuras 5.9 y 5.10 podemos observar varias imágenes de las nanopartículas p(HEI-co-VI), comprobando la obtención de nanopartículas mayoritariamente esféricas y tamaño acorde al obtenido mediante medidas de DLS.

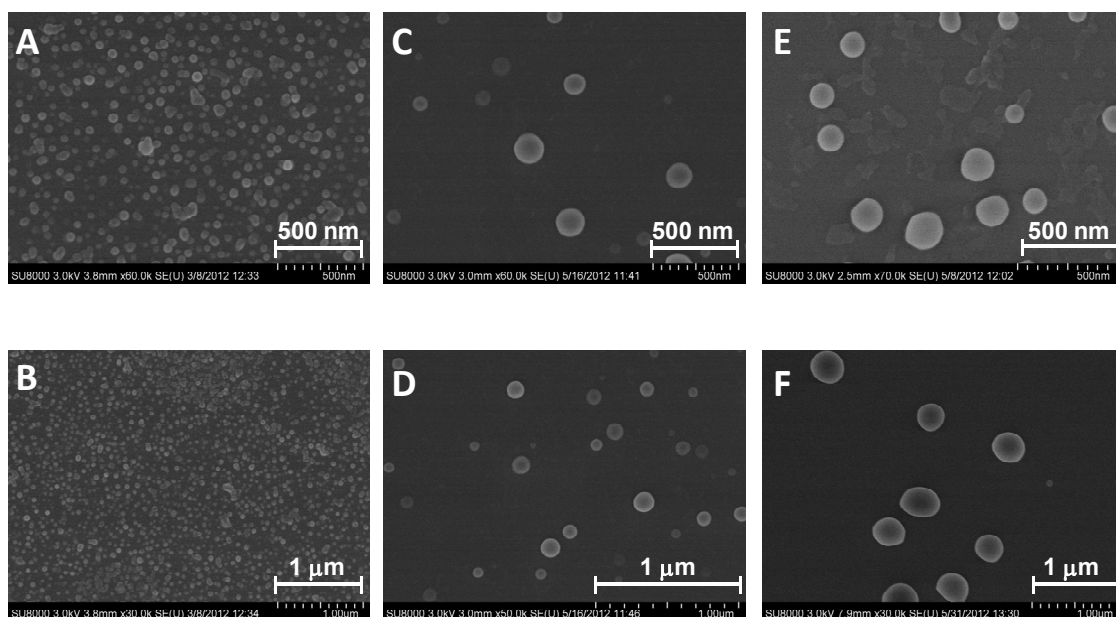


Figura 5.9. Imágenes obtenidas por SEM de las nanopartículas $p(\text{HEI-co-VI})$: A-B= NP37; C-D= NP60; E-F= NP92.

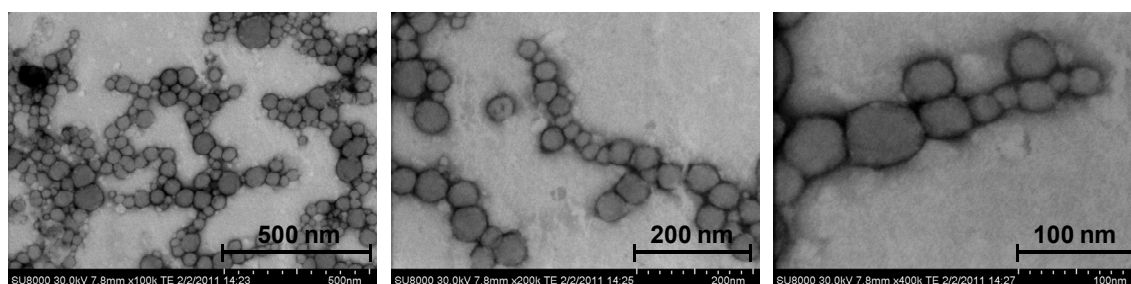


Figura 5.10. Imágenes obtenidas por TEM de las nanopartículas NP37.

5.3.4 Estudio de capacidad quelante de iones Zn^{2+}

En el presente trabajo se ha estudiado la formación de complejos entre los sistemas nanoparticulados $p(\text{HEI-co-VI})$ con el ión Zn^{2+} a través del par de electrones no compartido del anillo del imidazol dado el papel clave que juega este ión en la activación de las MMP tal y como se ha explicado en la introducción de este trabajo.

Para llevar a cabo este estudio se prepara la dispersión de nanopartículas según el procedimiento detallado en el Capítulo 3 (apartado 3.5.2.4), usando como fase acuosa una disolución de ZnCl_2 a una concentración diferente de Zn^{2+} para cada composición polimérica en la que se tiene en cuenta el contenido en el monómero VI, de forma que para los 3 sistemas NP37, NP60 y NP92 la relación molar VI: Zn^{2+} es 6:1 con el fin de garantizar el exceso de dicho monómero.⁸⁰⁻⁸² Este estudio se realiza a diferentes valores de pH para comprobar la influencia grado de protonación del imidazol con la cantidad de metal complejoado.

Los resultados se muestran en la Tabla 5.6, donde se puede observar claramente la alta capacidad de complejación de las nanopartículas de p(HEI-co-VI) preparadas en este trabajo, alcanzando valores de más del 50% de metal complejoado, resultados que concuerdan con los obtenidos por otros autores que ya han demostrado el alto poder quelante del grupo imidazol.⁸³⁻⁸⁶

Como es de esperar, la composición NP37 es la que presenta la mayor capacidad quelante ($\mu\text{g Zn}^{2+}$ complejoado/ μg nanopartículas), disminuyendo este valor a medida que disminuye el contenido en VI en el copolímero. Además, la tendencia general de todas composiciones demuestra la influencia del pH del medio: al aumentar el pH del medio aumenta la cantidad de metal complejoado, ya que el imidazol se va desprotonando, liberando el par de electrones del nitrógeno del anillo imidazol y por tanto aumentando la cantidad de Zn^{2+} complejoado.

$\mu\text{g Zn}^{2+}$ complejoado/ μg nanopartículas					
	pH= 3	pH= 4	pH= 5	pH= 6	pH= 7
NP37	13,8	13,7	14,7	16,5	18,6
NP60	4,8	4,7	7,1	8,0	9,7
NP92	0,05	0,06	1,0	1,3	1,5

Tabla 5.6. Resultados de la capacidad quelante de Zn^{2+} de los sistemas nanoparticulados *p(HEI-co-VI)* obtenidos a diferentes valores de pH.

Los resultados de este estudio ponen de manifiesto la gran importancia de la presencia de grupos funcionales en la superficie de las nanopartículas, los cuales confieren un gran potencial en la actividad química de las mismas y abre la posibilidad de la funcionalización de las nanopartículas para una posible aplicación, como por ejemplo, en la inhibición de la actividad de las MMP.

5.3.5 Liberación de ibuprofeno

Los estudios de liberación *in vitro* de ibuprofeno se llevaron a cabo a partir de las composiciones NP37, NP57 y NP92 según la metodología descrita en el Capítulo 3 (apartado 3.5.2.5).

Una de las principales ventajas que nos ofrecen las micelas formadas a partir de copolímeros en gradiente frente a las de los copolímeros en bloque está relacionada con el control de la liberación de fármacos. Los estudios microestructurales realizados en este trabajo nos han demostrado que debido a la diferente reactividad entre los monómeros HEI y VI, las macrocadenas formadas presentan un gradiente composicional a lo largo de

las mismas. Teniendo en cuenta este hecho, al formarse las micelas y colocarse la parte hidrófoba preferiblemente en el interior de las mismas, dicho núcleo no estará formado únicamente por unidades de HEI sino que habrá también, aunque en mucha menor proporción, unidades de VI. Lo mismo ocurre al estudiar la cubierta de la micelas, que no estará formada solamente por unidades de VI, sino también pero en mucha menor proporción por unidades de HEI. La presencia de unidades de VI (de naturaleza hidrófila) por toda la micela, no sólo en la parte más exterior, facilita el acceso de moléculas de agua al interior de la misma, ayudando por tanto al contacto entre el agua y el fármaco y facilitando su hidrólisis y liberación. Si comparamos los copolímeros en gradiente y los copolímeros de bloque, en éstos últimos el acceso de agua al interior de la micela está más impedido por lo que el control de la liberación es menor.⁸⁷ Es decir, los copolímeros en gradiente nos ofrecen por un lado una de las ventajas de los copolímeros de bloque (formación de estructuras micelares mediante procesos de autoensamblado) y por otro lado de los copolímeros estadísticos (mayor capacidad de carga del fármaco y mecanismo de liberación controlado y progresivo).⁸⁸

En la Figuras 5.11 y 5.12 se representan los perfiles de liberación de ibuprofeno obtenidos a pH 7 y 10 para los sistemas NP37, NP60 y NP92 a lo largo de 42 días de estudio. La liberación del fármaco está determinada no sólo por parámetros como el pH del medio sino también por el contenido en el fármaco, lo cual está directamente relacionado con la microestructura de las cadenas poliméricas.

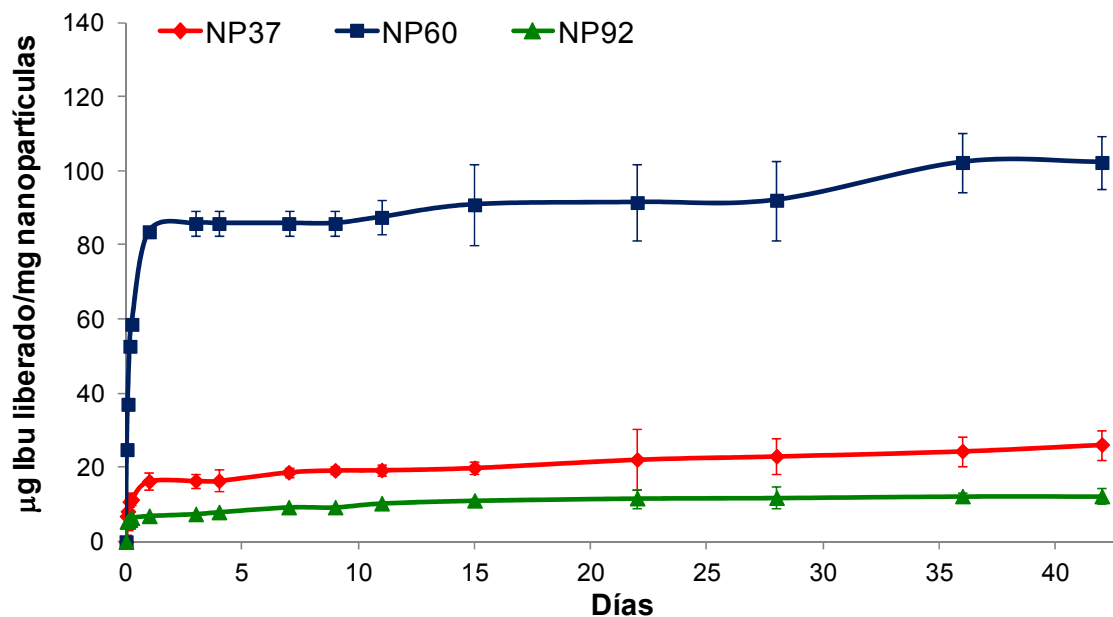


Figura 5.11. Perfiles de liberación de ibuprofeno a pH 7 de las nanopartículas $p(HEI-co-VI)$.

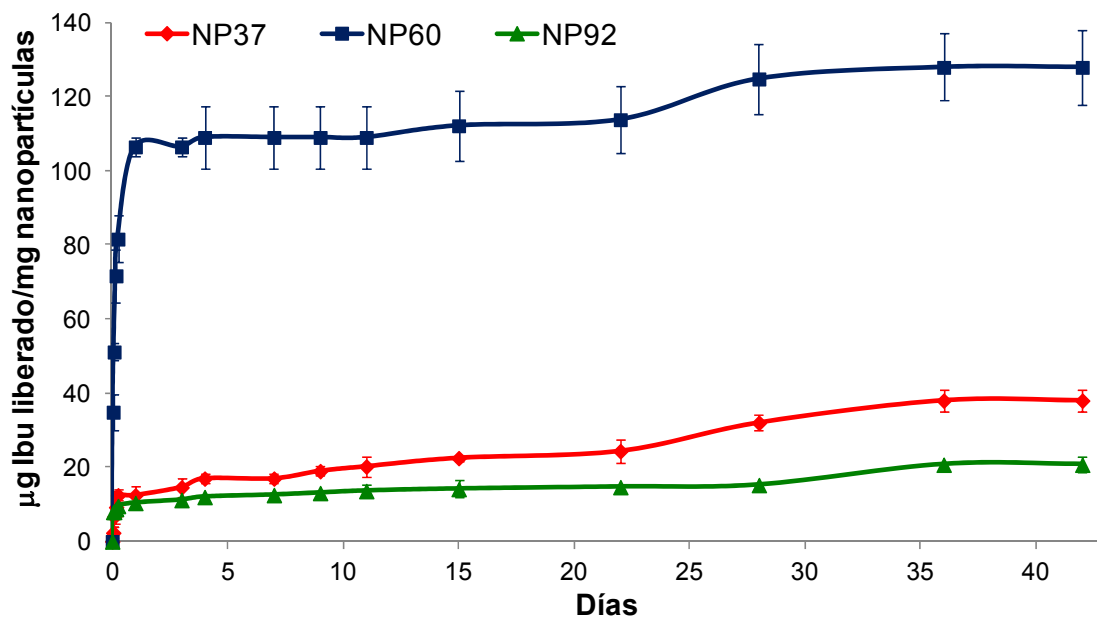


Figura 5.12. Perfiles de liberación de ibuprofeno a pH 10 de las nanopartículas $p(HEI-co-VI)$.

Como ocurría al estudiar los perfiles de liberación a partir de los mismos copolímeros (G37, G60 y G92) surge un balance competitivo entre el contenido en fármaco y la hidrofilia del sistema. En este caso también, es la composición NP60 la que alcanza un mayor porcentaje de ibuprofeno liberado, ya que por un parte presenta un mayor contenido en fármaco respecto a la composición NP37, así como un mayor carácter hidrófilo respecto a la composición NP90. Los resultados obtenidos son justificables basándonos en un mecanismo análogo al “mecanismo en cremallera”,⁸⁹ el cual tiene en cuenta las características microestructurales del copolímero. Como ya hemos visto en el capítulo anterior, la mayor presencia de heterotriadas HHV (siendo H= HEI y V= VI) en la composición NP60 respecto a las otras composiciones del estudio, favorece la hidrólisis del fármaco, creando a la vez nuevos dominios hidrófilos que favorecen el acceso de agua y liberación de ibuprofeno.

En cuanto a la influencia del pH, se observan mayores porcentajes de liberación a pH básico, resultado esperable ya que a pH básico está favorecida la hidrólisis del enlace éster que une el fármaco a la cadena polimérica.

Si comparamos la cantidad de ibuprofeno liberado por parte de los copolímeros p(HEI-co-VI) en forma de pastillas (copolímeros G37, G60 y G92, ver Capítulo 4 (apartado 4.5.5.2)) respecto a los mismos en forma de nanopartículas, vemos que se obtienen valores mayores cuando se emplean éstas últimas (Tabla 5.7). Este resultado se explica teniendo en cuenta el mayor acceso de agua hacia unidades de HEI en estos sistemas respecto a las pastillas de polímero, que al ser más “compactas” dificulta la hidratación de la matriz polimérica y por tanto la hidrólisis del ibuprofeno.

μg ibuprofeno liberado/mg polímero ó mg nanopartículas						
	G37	NP37	G60	NP60	G92	NP92
pH= 7	13,0	26,2	29,3	102,3	10,0	12,3
pH= 10	22,2	38,0	33,1	127,9	11,1	20,7

Tabla 5.7. Cantidad de ibuprofeno liberado a pH 7 y pH 10 a partir de pastillas (G37, G60, G92) y nanopartículas (NP37, NP60, NP92) de p(HEI-co-VI) tras 42 días de estudio.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la importancia tanto del contenido en fármaco como del carácter hidrófilo/hidrófobo del sistema, así como del pH del medio a la hora del diseño de sistemas de liberación de fármacos. Además, abre las puertas a la posible utilización de estos sistemas nanométricos como sistemas de liberación controlada de fármacos para su aplicación en procesos antiinflamatorios.

5.3.6 Estudios de biocompatibilidad *in vitro*

5.3.6.1 Determinación de la concentración inhibitoria del 50% (IC_{50})

En el capítulo anterior ya hemos demostrado la alta biocompatibilidad de los copolímeros p(HEI-co-VI). El objetivo de este ensayo es comprobar la toxicidad de los mismos en forma de nanopartículas así como determinar la IC_{50} en los cultivos celulares para conocer el intervalo de concentración de nanopartículas óptimo para su aplicación *in vivo*. Mediante el ensayo MTT de citotoxicidad se determina la concentración IC_{50} de cada uno de los sistemas nanoparticulados preparados en este trabajo empleando células

HUVECS y siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 3 (apartado 3.5.2.6.1).

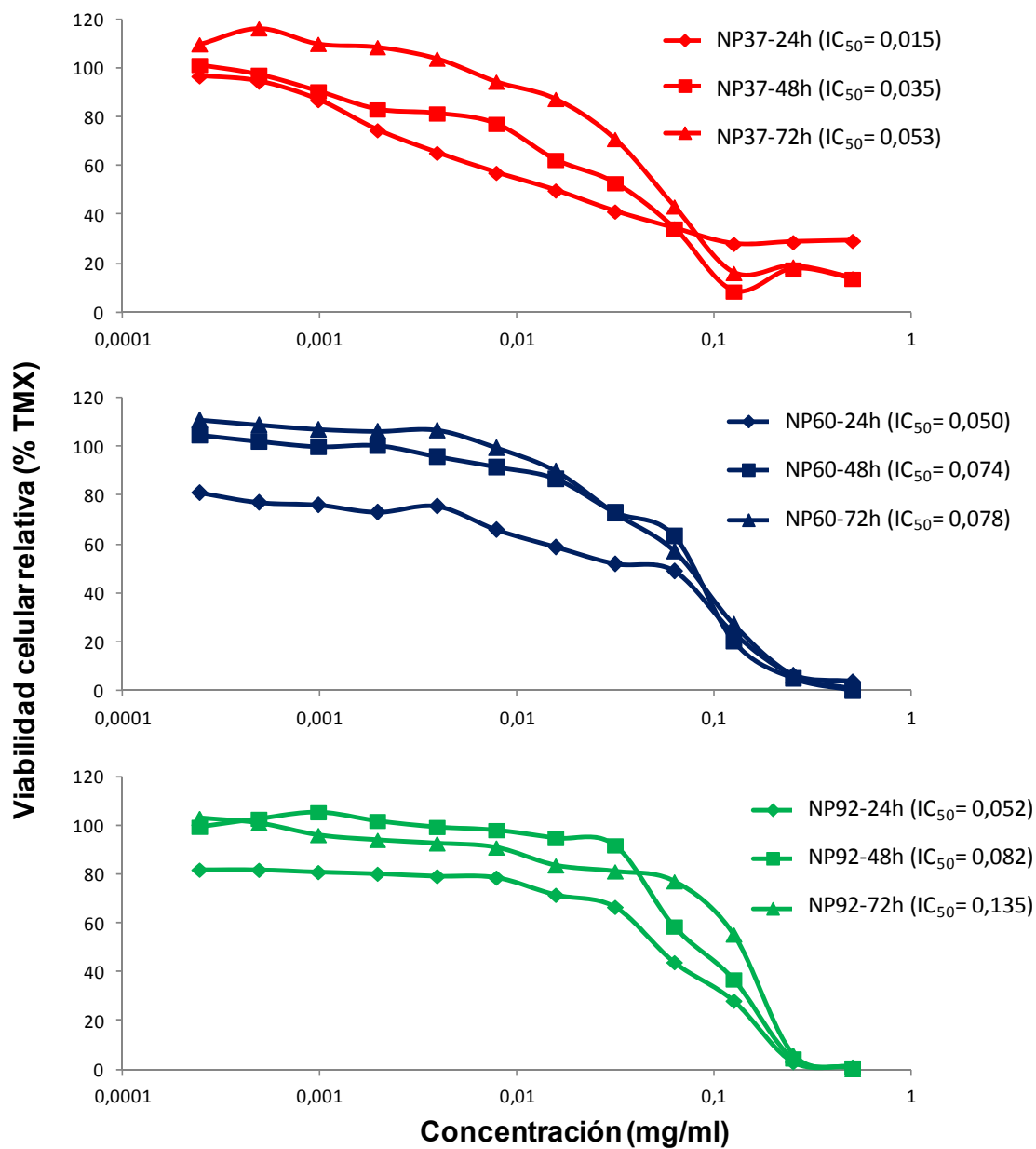


Figura 5.13. Curvas dosis-respuesta de los extractos de nanopartículas *p*(HEI-co-VI) normalizadas respecto al control (TMX) a los diferentes tiempos de estudio y resultados de IC_{50} obtenidos.

En la Figura 5.13 se representan las curvas dosis-respuesta obtenidas para los tres sistemas nanoparticulados a los diferentes tiempos de estudio (24, 48 y 72 horas) y para todas las concentraciones empleadas. Al aumentar el tiempo de incubación y contacto entre las células y las nanopartículas la viabilidad celular se ve afectada, aumentando en todos los casos los valores de IC_{50} . A las 72 horas de estudio es la composición NP92 la menos citotóxica, poniendo de manifiesto el complicado y no determinado mecanismo de citotoxicidad dependiente de varios factores como la carga de la partícula, cantidad de fármaco, procesos de endocitosis, fenómenos de agregación, etc., que pueden influir en la viabilidad celular.

Si comparamos los datos de viabilidad celular obtenidos a las 24 horas de estudio de los extractos procedentes de los copolímeros G37, G60 y G92 (Capítulo 4, apartado 4.5.6.1) frente a los resultados obtenidos con los mismos copolímeros en forma de nanopartículas, vemos que en este último caso la viabilidad celular se ve reducida, posiblemente por la mayor interacción con las células.

5.3.6.2 Evaluación de la actividad antiinflamatoria

Dados los resultados obtenidos en los estudios de complejación de metal y de liberación de fármaco, es de gran importancia determinar la capacidad antiinflamatoria de las nanopartículas. Para ello se realiza el ensayo de reducción en la producción de NO, método que nos permite cuantificar la capacidad antiinflamatoria de los sistemas en términos de reducción del NO producido por células previamente estimuladas por la adición de un LPS. El ensayo de inhibición de NO es usado frecuentemente para medir la actividad antiinflamatoria ya que durante el proceso inflamatorio se produce la liberación de mediadores químicos muy

citotóxicos, entre ellos el NO. El NO es una molécula gaseosa que difunde fácilmente a través de las células, es sintetizado por la enzima óxido nítrico sintasa y desempeña un papel fundamental durante la inflamación.⁹⁰ Ciertos mediadores, como por ejemplo los lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas, incrementan la síntesis de este radical en respuesta a un daño tisular o infección.⁹¹ Los tipos celulares implicados en la producción de NO durante el proceso inflamatorio son, por ejemplo, los macrófagos,^{92,93} línea celular empleada para la realización de este ensayo.

Este ensayo se realiza con las tres composiciones de estudio a concentraciones no citotóxicas con el fin de evitar errores de interpretación en los resultados. No obstante, para comprobar la alta viabilidad de las células durante el ensayo, se realiza al mismo tiempo el ensayo MTT.

Los resultados obtenidos permiten demostrar que los sistemas nanoparticulados de este trabajo presenta una alta inhibición de la producción de NO con respecto al control (Figura 5.14), es decir, presentan un gran poder antiinflamatorio. Se observa una clara dependencia con la composición polimérica aplicada. Así, para la composición NP37 los datos varían entre un 40 y 47%; para la composición NP60 entre 55 y 66% y para el sistema NP92 entre 12 y 42% de inhibición, existiendo también relación con la dosis aplicada, sobre todo para el caso de la composición NP92, con la que se obtienen resultados muy diferentes en función de la concentración de nanopartículas empleada.

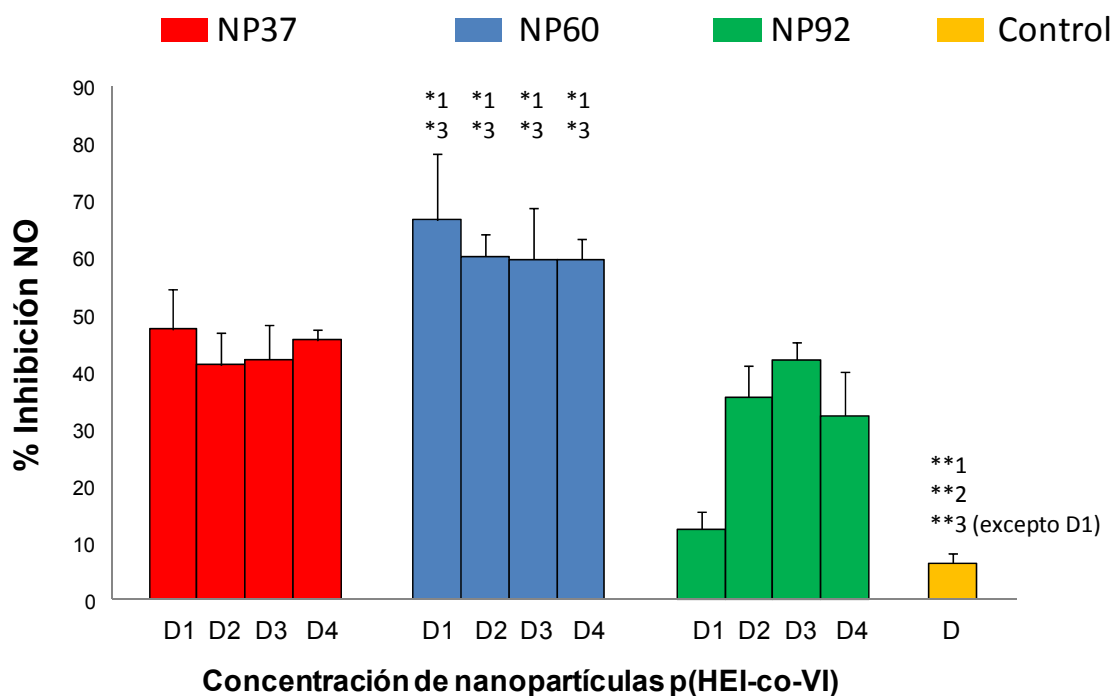


Figura 5.14. Porcentajes de inhibición en la producción de NO de las nanopartículas p(HEI-co-VI). D1-D4= concentración de NP= 2-1-0,5-0,1 $\mu\text{g/ml}$. D= concentración de LPS= 1 $\mu\text{g/ml}$. Se representan las diferencias significativas respecto a la composición NP37⁽¹⁾, NP60⁽²⁾ y NP92⁽³⁾, siendo $*p<0,05$ y $**p<0,001$.

El alto poder de complejación de Zn^{2+} junto con el mayor porcentaje de ibuprofeno liberado, hace que la composición NP60 sea la que presente una mayor capacidad antiinflamatoria.

Los análisis realizados de viabilidad celular (ensayo MTT) muestran resultados por encima del 70% en todos los casos (Figura 5.15), por lo que se puede garantizar que la inhibición de NO es debida a la capacidad antiinflamatoria de los sistemas y no a muerte celular.

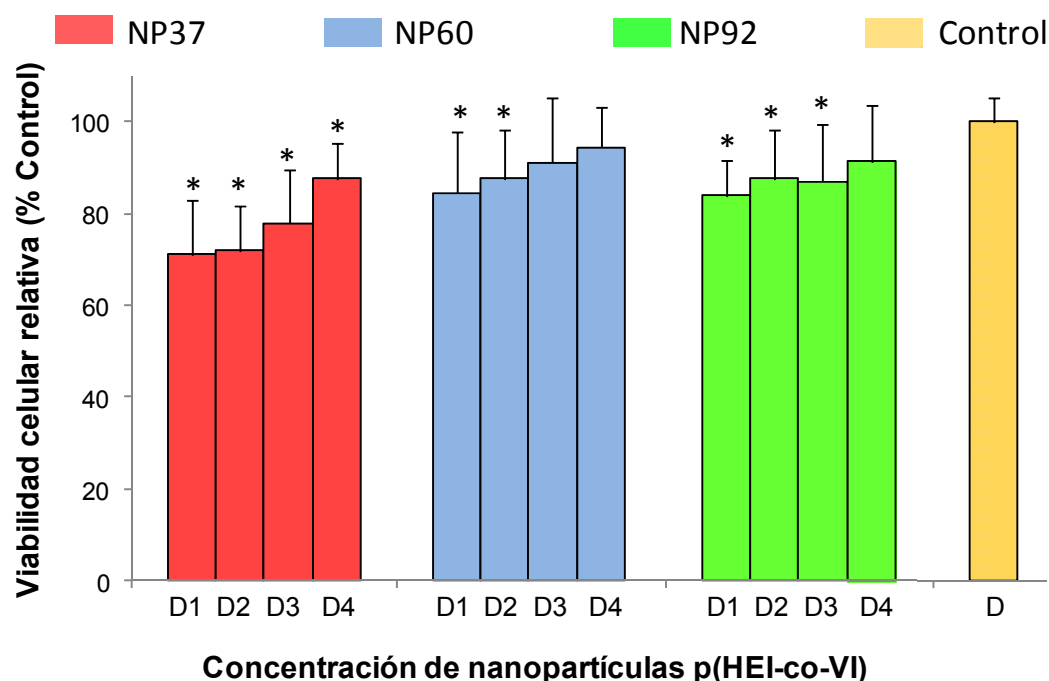


Figura 5.15. Resultados de citotoxicidad de las nanopartículas p(HEI-co-VI). D1-D4= concentración de NP= 2-1-0,5-0,1 $\mu\text{g/ml}$. D= concentración de LPS= 1 $\mu\text{g/ml}$. Se representa la media \pm error estándar de la media ($n=16$) y las diferencias significativas respecto al control siendo $p<0,05$.

5.4 BIBLIOGRAFÍA

¹ Riehemann, K.; Schneider, S.W.; Luger, T.A.; Godin, B.; Ferrari, M.; Fuchs, H. *Angewandte Chemie International Edition*, **2009**, 48, 872-897.

² Samitier, J. *Presentación del Lanzamiento Público de la Plataforma Española de Nanomedicina*, **2005**. <http://www.nanomedspain.net>

³ Shi, J.; Votruba, A.R.; Farokhzad, O.C.; Langer, R. *Nano Letters*, **2010**, 10, 3223-3230.

- ⁴ ESF Scientific Forward Look on Nanomedicine. *European Science Foundation*, **2005**. <http://www.esf.org/publication/196/ESPB23.pdf>.
- ⁵ Hans, M.L.; Lowman, A.M. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, **2002**, *6*, 319–327.
- ⁶ Farokhzad, O.C.; Langer, R. *ACS Nano*, **2009**, *3*, 16-20.
- ⁷ Gupta, B.; Torchilin, V.P. *Cancer Immunology Immunotherapy*, **2007**, *6*, 1215-1223.
- ⁸ Tan, M.L.; Choong, P.F.M.; Dass, C.R. *Peptides*, **2010**, *31*, 184-193.
- ⁹ Li, X.; Chen, Y.; Wang, M.; Ma, Y.; Xia, W.; Gu, H. *Biomaterials*, **2013**, *34*, 1391-1401.
- ¹⁰ Alyaudtin, R.N.; Reichel, A.; Löbenberg, R.; Ramge, P.; Kreuter, J.; Begley, D.J. *Journal of Drug Targeting*, **2001**, *9*, 209-221.
- ¹¹ Wong, H.L.; Bendayan, R.; Rauth, A.M.; Li, Y.; Wu, X.Y. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2007**, *59*, 491-504.
- ¹² Panyam, J.; Labhasetwar, V. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2003**, *55*, 329-347.
- ¹³ He, H.; Li, Y.; Jia, X.R.; Du, J.; Ying, X.; Lu, W.L.; Lou, J.N.; Wei, Y. *Biomaterials*, **2011**, *23*, 478-487.
- ¹⁴ Dutta, T.; Jain, N.K. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2007**, *1770*, 681-686.
- ¹⁵ Couvreur, P.; Fattal, E.; Legrand, P.; Vauthier, C. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, **2002**, *19*, 99-134.
- ¹⁶ Miyata, K.; Christie, R.J.; Kataoka, K. *Reactive and Functional Polymers*, **2011**, *71*, 227-234.

- ¹⁷ Nakayama, M.; Okano, T.; Miyazaki, T.; Kohori, F.; Sakai, K.; Yokoyama, M. *Journal of Controlled Release*, **2006**, *115*, 46-56.
- ¹⁸ Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2012**, *64*, 37-48.
- ¹⁹ Whitmire, R.E.; Wilson, D.S.; Singh, A.; Levenston, M.E.; Murthy, N.; García, A.J. *Biomaterials*, **2012**, *33*, 7665-7675.
- ²⁰ Coco, R.; Plapied, L.; Pourcelle, V.; Jérôme, C.; Brayden, D.J.; Schneider, Y.J.; Préat, V. *International Journal of Pharmaceutics*, **2013**, *440*, 3-12.
- ²¹ Allard, E.; Passirani, C.; Benoit, J.P. *Biomaterials*, **2009**, *30*, 2302-2318.
- ²² Wong, H.L.; Wu, X.Y.; Bendayan, R. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2012**, *64*, 686-700.
- ²³ Ozay, O.; Akcali, A.; Otkun, M.T.; Silan, C.; Aktas, N.; Sahiner, N. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2010**, *79*, 460-466.
- ²⁴ Uchegbu, I.F.; Siew, A. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2013**, *102*, 305-310.
- ²⁵ Parveen, S.; Misra, R.; Sahoo, S.K. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **2012**, *8*, 147-166.
- ²⁶ Wang, A.Z.; Langer, R.; Farokhzad, O.C. *Annual Review of Medicine*, **2012**, *63*, 185-198.
- ²⁷ Kocbek, P.; Obermajer, N.; Cegnar, M.; Kos, J.; Kristl, J. *Journal of Controlled Release*, **2007**, *120*, 18-26.
- ²⁸ Sahu, S.K.; Maiti, S.; Maiti, T.K.; Ghosh, S.K.; Pramanik, P. *Journal of Drug Targeting*, **2011**, *19*, 104-113.

- ²⁹ Cheng, R.; Meng, F.; Deng, C.; Klok, H.A.; Zhong, Z. *Bioamaterials*, **2013**, *34*, 3647-3657.
- ³⁰ Kievit, F.M.; Wang, F.Y.; Fang, C.; Mok, H.; Wang, K.; Silber, J.R.; Ellenbogen, R.G.; Zhang, M.Q. *Journal of Controlled Release*, **2011**, *152*, 76-83.
- ³¹ Yigit, M.V.; Moore, A.; Medarova, Z. *Pharmaceutical Research*, **2012**, *29*, 1180-1188.
- ³² Ganta, S.; Devaalapally, H.; Shahiwala, A.; Amiji, M. *Journal of Controlled Release*, **2008**, *126*, 187-204.
- ³³ Li, M.; Li, G.L.; Zhang, Z.; Li, J.; Neoh, K.G.; Kang, E.T. *Polymer*, **2010**, *51*, 3377-3386.
- ³⁴ Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2001**, *46*, 3-26.
- ³⁵ Yalkowsky, S.H. *Techniques of Solubilization of Drugs*. Marcel Dekker. **1981**. Nueva York.
- ³⁶ Rösler, A.; Vandermeulen, G.W.M.; Klok, H.A. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2012**, *64*, 270-279.
- ³⁷ Dutta, P.; Shrivastava, S.; Dey, J. *Macromolecular Bioscience*, **2009**, *9*, 1116-1126.
- ³⁸ Zhang, S. *Nature Biotechnology*, **2003**, *21*, 1171-1178.
- ³⁹ Zhao, X.; Zhang, S. *Chemical Society Reviews*, **2006**, *35*, 1105-1110.
- ⁴⁰ Mayol, L.; Biondi, M.; Russo, L.; Malle, B.M.; Schwach-Abdellaoui, K.; Borzacchiello, A. *Carbohydrate Polymers*, **2014**, *102*, 110-116.

- ⁴¹ Torchilin, V.P. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2004**, *61*, 2549-2559.
- ⁴² Wang, F.; Zhang, D.; Duan, C.; Jia, L.; Feng, F.; Liu, Y.; Wang, Y.; Hao, L.; Zhang, Q. *Carbohydrate Polymers*, **2011**, *84*, 1192-1200.
- ⁴³ Torchilin, V.P. *Journal of Controlled Release*, **2001**, *73*, 137-172.
- ⁴⁴ Shin, H.C.; Alani, A.W.G.; Rao, D.A.; Rockich, N.C.; Kwon, G.S. *Journal of Controlled Release*, **2009**, *140*, 294-300.
- ⁴⁵ Le Garrec, D.; Gori, S.; Luo, L.; Lessard, D.; Smith, D.C.; Yessine, M.A.; Ranger, M.; Leroux, J.C. *Journal of Controlled Release*, **2004**, *99*, 83-101.
- ⁴⁶ Miyata, K.; Christie, R.J.; Kataoka, K. *Reactive and Functional Polymers*, **2011**, *71*, 227-234.
- ⁴⁷ Yokoyama, M. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, **2011**, *3*, 151-158.
- ⁴⁸ Lukyanov, A.N.; Torchilin, V.P. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2004**, *56*, 1273- 1289.
- ⁴⁹ Shin, H.C.; Cho, H.; Lai, T.C.; Koza, K.R.; Kolesar, J.M.; Kwon, G.S. *Journal of Controlled Release*, **2012**, *163*, 93-99.
- ⁵⁰ Zhang, Z.; Xiong, X.; Wan, J.; Xiao, L.; Gan, L.; Feng, Y.; Xu, H.; Yang, X. *Biomaterials*, **2012**, *33*, 7233-7240.
- ⁵¹ Cho, H.; Lai, T.C.; Kwon, G.S. *Journal of Controlled Release*, **2013**, *166*, 1-9.
- ⁵² Zhang, L.; He, Y.; Ma, G.; Song, C.; Sun, H. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **2012**, *8*, 925-934.

- ⁵³ Wang, L.; Zeng, R.; Li, C.; Qiao, R. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2009**, *74*, 284-292.
- ⁵⁴ Benahmed, A.; Ranger, M.; Leroux, J.C. *Pharmaceutical Research*, **2001**, *18*, 323-328.
- ⁵⁵ Li, C.; Wallace, S. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2008**, *60*, 886-898.
- ⁵⁶ Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U.S. *Angewandte Chemie International Edition*, **2010**, *49*, 6288-6308.
- ⁵⁷ Gu, P.F.; Xu, H.; Sui, B.W.; Gou, J.X.; Meng, L.K.; Sun, F.; Wang, X.J.; Qi, N.; Zhang, Y.; He, H.B.; Tang, X. *International Journal of Nanomedicine*, **2012**, *7*, 109-122.
- ⁵⁸ Kwon, G.S.; Kataokab, K. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1995**, *16*, 295-309.
- ⁵⁹ Shu, S.; Zhang, X.; Teng, D.; Wang, Z.; Li, C. *Carbohydrate Research*, **2009**, *344*, 1197-1204.
- ⁶⁰ Yokoyama, M.; Kwon, G.S.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Seto, T.; Kataoka, K. *Bioconjugate Chemistry*, **1992**, *3*, 295-301.
- ⁶¹ Shahin, M.; Lavasanifar, A. *International Journal of Pharmaceutics*, **2010**, *389*, 213-222.
- ⁶² Mahmud, A.; Xiong, X.B.; Lavasanifar, A. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2008**, *69*, 923-934.
- ⁶³ Milonaki, Y.; Kaditi, E.; Pispas, S.; Demetzos, C. *Journal of Polymer Science part A: Polymer Chemistry*, **2011**, *50*, 1226-1237.

- ⁶⁴ Marques, J.G.; Gaspar, V.M.; Costa, E.; Paquete, C.M.; Correia, I.J. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2014**, *113*, 375-383.
- ⁶⁵ García-Fernández, L.; Aguilar, M.R.; Fernández, M.M.; Lozano, R.M.; Giménez, G.; Valverde, S.; San Román, J. *Biomacromolecules*, **2010**, *11*, 1763-1772.
- ⁶⁶ García-Fernández, L.; Aguilar, M. R.; Ochoa-Callejero, L.; Abradelo, C.; Martínez, A.; San Román, J. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **2012**, *23*, 129-135.
- ⁶⁷ López-Donaire, M.L; Sussman, E.M.; Fernández-Gutiérrez, M.; Méndez-Vilas, A.; Ratner, B.D.; Vázquez-Lasa, V.; San Román, J. *Biomacromolecules*, **2012**, *13*, 624-635.
- ⁶⁸ Zhang, J.; Fan, H.; Levorse, D.A.; Crocker, L.S. *Langmuir*, **2011**, *27*, 1907-1914.
- ⁶⁹ Srivastava, A.; Waite, J.H.; Stucky, G.D.; Mikhailovsky, A. *Macromolecules*, **2009**, *42*, 2168-2176.
- ⁷⁰ Asayama, S.; Sekine, T.; Kawakami, H.; Nagaoka, S. *Bioconjugate Chemistry*, **2007**, *18*, 1662-1667.
- ⁷¹ Velasco, D.; Réthoré, G.; Newland, B.; Parra, J.; Elvira, C.; Pandit, A.; Rojo, L.; San Román, J. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2012**, *82*, 465-474.
- ⁷² Berne, B.J.; Pecora, R. *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. Dover Publications. **2000**. Nueva York.
- ⁷³ Jacobs, C.; Müller, R.H. *Pharmaceutical Research*, **2002**, *19*, 189-194.

- ⁷⁴ Puhl, A.C.; Fagundes, M.; dos Santos, K.C.; Polikarpov, I.; das Graças Fernandes da Silva, M.F.; Fernandes, J.B.; Vieira, P.C.; Forim, M.R. *International Journal of Drug Delivery*, **2011**, *3*, 683-698.
- ⁷⁵ Wu, L.; Zhang, J.; Watanabe, W. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2011**, *63*, 456-469.
- ⁷⁶ Komalam, A.; Muraleegharan, L.G.; Subburaj, S.; Suseela, S.; Babu, A.; George, S. *International Nano Letters*, **2012**, *2*, 1-9.
- ⁷⁷ Muller, R.H.; Jacobs, C.; Kayser, O. *Advanced Drug Delivery*, **2001**, *47*, 3-19.
- ⁷⁸ Kim, G.M.; Bae, Y.H.; Jo, W.H. *Macromolecular Bioscience*, **2005**, *5*, 1118-1124.
- ⁷⁹ Lee, E.S.; Na, K.; Bae, Y.H. *Nano Letters*, **2005**, *5*, 325-329.
- ⁸⁰ Pekel, N.; Güven, O. *Colloid and Polymer Science*, **1999**, *277*, 570-573.
- ⁸¹ Pekel, N.; Güven, O. *Polymer Bulletin*, **2004**, *51*, 307-314.
- ⁸² Pekel, N.; Güner, A.; Güven, O. *Journal of Applied Polymer Science*, **2002**, *85*, 376-384.
- ⁸³ Andersson, M.; Hansson, O.; Ohrstrom, L.; Idstrom, A.; Nyden, M. *Colloid and Polymer Science*, **2011**, *289*, 1361-1372.
- ⁸⁴ Asayama, S.; Nishinohara, S.; Kawakami, H. *Bioconjugate Chemistry*, **2011**, *22*, 1864-1868.
- ⁸⁵ Takafuji, M.; Ide, S.; Ihara, H.; Xu, Z.H. *Chemistry of Materials*, **2004**, *16*, 1977-1983.

- ⁸⁶ Jancso, A.; Andras, K.; Gyurcsik, B.; Nagy, N.V.; Gajda, T. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2009**, *103*, 1634-1643.
- ⁸⁷ Soussan, E.; Cassel, S.; Blanzat, M.; Rico-Lattes, I. *Angewandte Chemie International Edition*, **2009**, *48*, 274-288.
- ⁸⁸ Gallardo, A.; Rodríguez, G.; Aguilar, M.R.; Fernández, M.; San Román, J. *Macromolecules*, **2003**, *36*, 8876-8880.
- ⁸⁹ Gallardo, A.; Rodríguez, G.; Fernández, M.; Aguilar, M.R.; Román, J.S. *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition*, **2004**, *15*, 917-928.
- ⁹⁰ Wang, S.Y.; Lan, X.Y.; Xiao, J.H.; Yang, J.C.; Kao, Y.T.; Chang, S.T. *Phytotherapy Research*, **2008**, *22*, 213-216.
- ⁹¹ Kojima, M.; Morisaki, T.; Izuhara, K.; Uchiyama, A.; Matsunari, Y.; Katano, M.; Tanaka, M. *Oncogen*, **2000**, *19*, 1225-1231.
- ⁹² Koziol, A.; Martín-Alonso, M.; Clemente, C.; Gonzalo, P.; Arroyo, A.G. *European Journal of Cell Biology*, **2012**, *91*, 889-895.
- ⁹³ MacMicking, J.; Xie, Q.W.; Nathan, C. *Annual Review of Immunology*, **1997**, *15*, 323-350.

Capítulo 6

COPOLÍMEROS HIDRÓFOBOS DERIVADOS DE IBUPROFENO PARA SU APLICACIÓN EN DISPOSITIVOS VASCULARES

6.1 INTRODUCCIÓN

Según datos de la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en todo el mundo con 17,3 millones de muertes por año, una cifra que se espera supere los 23,6 millones en el año 2030.^{1,2} Dentro del amplio abanico de trastornos que se consideran enfermedades cardiovasculares (del corazón y de los vasos sanguíneos), la **enfermedad arterial coronaria** (EAC) es el tipo más común y la principal causa de mortalidad por enfermedad cardiovascular. La raíz más frecuente de la EAC es una enfermedad denominada aterosclerosis que se produce cuando se forma una sustancia cérea dentro de las arterias que riegan el corazón.^{3,4} Esta sustancia, denominada placa, está compuesta principalmente de colesterol, compuestos grasos, calcio y una sustancia coagulante denominada fibrina. A medida que se acumula la placa, la arteria se estrecha, dificultando el flujo de sangre al corazón (Figura 6.1A). A medida que aumenta el grado de obstrucción, se reduce el flujo de sangre, provocando en el paciente una angina de pecho o un ataque cardíaco.

Desde finales de los años setenta el tratamiento por excelencia de la EAC ha sido la **angioplastia transluminal percutánea (ATC) o angioplastia con balón**.⁵ El procedimiento de la ATC consiste en introducir en la arteria un catéter provisto de un pequeño balón que al inflarse comprime la placa contra la pared arterial consiguiendo ampliar la abertura del vaso y restablecer el flujo sanguíneo (Figura 6.1B). Aunque esta técnica supuso desde sus comienzos un gran avance científico y fue ocupando progresivamente el primer lugar en el tratamiento de la EAC, la ATC presenta dos importantes complicaciones: la oclusión coronaria y la reestenosis.^{6,7} La oclusión es un fenómeno agudo que se produce durante el procedimiento o en las 24 horas siguientes y es causada fundamentalmente por la disección de la pared arterial o por trombosis. La otra complicación, la **reestenosis**, consiste en la reducción de la luz del vaso después de realizar

un procedimiento intervencionista en el mismo y supone la respuesta cicatrizal de la arteria tras la agresión inducida durante la angioplastia coronaria.

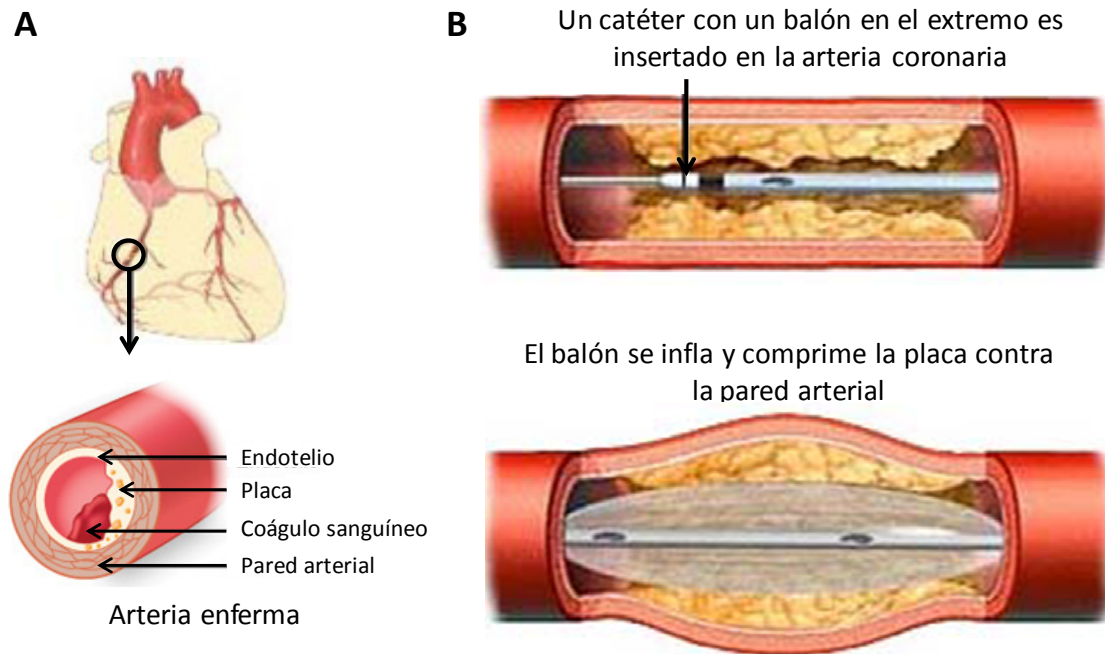


Figura 6.1. A) Representación de una arteria enferma por aterosclerosis.

B) Proceso de ATC tradicional.

Así, con el propósito de optimizar los resultados a corto y largo plazo de la angioplastia con balón, a mediados de la década de los ochenta se desarrollaron los **stents coronarios**.^{8,9} El stent es una malla metálica de forma tubular que al implantarse dentro de la arteria coronaria actúa como un soporte o armazón que mantiene abierto el vaso sanguíneo, contribuyendo así a mejorar el flujo de sangre al músculo cardíaco. Los procedimientos de colocación del stent generalmente se realizan junto con una angioplastia con balón (Figura 6.2A). En la década de los noventa esta tecnología pasó a ser ampliamente aceptada como una estrategia terapéutica prometedora para los pacientes con enfermedad coronaria,

publicándose ensayos sobre la superioridad de los stents metálicos sin recubrimiento respecto a la angioplastia con balón.¹⁰

Gracias a los stents coronarios pronto se observó una reducción del número de casos de oclusión del vaso de alrededor del 20-30% en relación a la ATC. Sin embargo, el problema de reestenosis continuaba siendo una limitación importante de esta técnica, observándose un significativo número de pacientes que seguían presentando una nueva recurrencia de reestenosis en el interior del stent en los meses siguientes a su implantación (alrededor del 15-20% de los casos), proceso que se denominó **reestenosis intra-stent**.¹¹⁻

¹⁴ La reestenosis intra-stent se define como la aparición de una nueva estenosis angiográfica en el interior del stent, siendo éste un proceso complejo que se inicia con el daño causado por el balón o el stent en la pared arterial en el momento de la ATC y que parece estar condicionado por múltiples factores (características clínicas, forma de implantación, características anatómicas de la lesión tratada, tipo de stent, etc.).¹⁵ El principal mecanismo involucrado en la reestenosis intra-stent es la proliferación neointimal o hiperplasia neointimal que se produce a través y dentro del stent procedente de las capas externas del vaso, siendo el resultado del daño endotelial producido por cualquier instrumento utilizado para realizar la ATC y está mediada por mecanismos inflamatorios.¹⁶⁻¹⁹ La pérdida de la capa endotelial expone el colágeno subyacente al torrente sanguíneo y al contactar con los receptores de membrana de las plaquetas desencadena un proceso de adherencia y agregación posterior. Las plaquetas activadas liberan un factor de crecimiento que actúa de forma local sobre las células musculares lisas provocando su migración y proliferación. Existen otros factores liberados por el endotelio lesionado y por macrófagos atraídos a la zona de angioplastia como parte de la respuesta inflamatoria y que constituyen un estímulo para la proliferación de las células musculares lisas provocando de esta forma una nueva reducción de la luz del vaso sanguíneo. Al mismo tiempo, y a partir de los bordes laterales de la lesión comienzan a

migrar y proliferar células endoteliales sanas con el fin de recubrir la lesión, siendo este proceso el único que puede poner fin a la proliferación de las células musculares lisas.^{15,20}

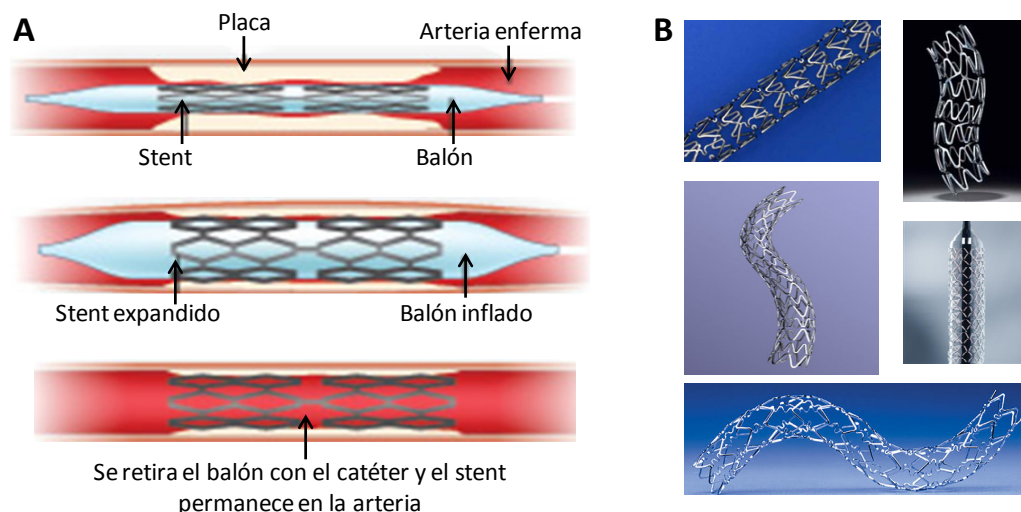


Figura 6.2. A) Etapas del proceso de colocación del stent con angioplastia con balón. B) Ejemplos de stents liberadores de fármacos comercializados en la actualidad.

Por ello, a partir del conocimiento del mecanismo biológico de la reestenosis, desde hace años se vienen buscando tratamientos para disminuir o prevenir este fenómeno proliferativo, surgiendo así el concepto de los **stents liberadores de fármacos** (Drug Eluting Stent, DES)⁹ y con ellos el desarrollo de recubrimientos poliméricos (naturales o sintéticos) que puedan actuar como sistemas de dosificación controlada de medicamentos específicos que inhiban los procesos de respuesta celular y controlen la hiperplasia en la zona del stent implantado, y por tanto la reestenosis. Las principales características que debe tener un DES es la estabilización biomecánica del flujo sanguíneo así como el efecto terapéutico proporcionado mediante la liberación de medicamentos específicos directamente en la zona afectada. Estos nuevos stents son por tanto dispositivos muy complejos que

involucran la tecnología y diseño del stent, investigación y desarrollo en el terreno de los polímeros que actúan como transportadores y liberadores de los fármacos y el propio fármaco que debe inhibir la proliferación neointimal. Veamos las principales características y estudios relacionados con los polímeros y los fármacos del DES:

❖ Los polímeros:

El polímero que recubre el stent debe cumplir una serie de requisitos como por ejemplo:^{21,22}

- Carácter no trombogénico (hemocompatibilidad)
- Carácter no inflamatorio (biocompatibilidad)
- Estabilidad biomecánica a largo plazo
- Propiedades mecánicas adecuadas para poder soportar la fuerza de contracción y expansión del stents sin que se produzcan fracturas, roturas o desprendimiento de partículas de polímero
- Inalterabilidad de sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas por los procesos de manipulación y esterilización del producto final
- Control del mecanismo de liberación de medicamentos para alcanzar niveles terapéuticos durante el tiempo necesario y así conseguir un efecto adecuado

Los polímeros empleados para el recubrimiento de los stents pueden dividirse en no biodegradables y biodegradables. La mayoría de DES de primera generación disponibles en el mercado actualmente utilizan polímeros no biodegradables como transportadores del fármaco, en los que la difusión del fármaco se realiza por gradiente de concentración entre el polímero y el tejido. Una vez que el fármaco se ha liberado del stent el polímero permanece en contacto con la pared vascular. Dentro de este grupo destaca el uso del poli(metacrilato de butilo) y el poli(etileno-co-acetato de vinilo), presentes en el stent *Cypher®* (Cordis), ambos polímeros no biodegradables que son utilizados también en otras aplicaciones clínicas,

como en cementos óseos y lentes oculares.^{23,24} Otro ejemplo de stent recubierto con un polímero no biodegradable es el stent *ENDEAVOR*[®] (Medtronic), el cual emplea un copolímero de metacriloilfosforilcolina y laurilmetacrilato, denominado fosforilcolina. Este copolímero es una copia sintética del principal componente fosfolipídico de la membrana externa de los hematíes e inhibe la adsorción de proteínas y la adhesión y activación de las plaquetas, por lo que reduce la formación del trombo.^{25,26} Otros ejemplos son el copolímero hidrofóbico tribloque “SIBS” (poli[estireno-*b*-isobutileno-*b*-estireno]) empleado en el stent *TAXUS*[®] (Boston Scientific)^{27,28} o el copolímero no biodegradable a base de un polímero acrílico y un fluoropolímero presente en el stent *XIENCE*[®] V (Abbot Vascular).²⁵ En la Figura 6.2B se muestran ejemplos de varios stents comercializados actualmente.

Los recubrimientos con polímeros biodegradables facilitan la liberación del fármaco hacia la pared vascular y luego se reabsorben sin dejar secuelas a largo plazo. Desde su introducción en 2004, se han desarrollado numerosos stents recubiertos con polímeros biodegradables, sobre todo después de que se planteara la hipótesis de que esta tecnología podría reducir el riesgo de la trombosis tardía asociada al uso de los polímeros no biodegradables.²⁹⁻³¹ Los copolímeros de PLA, poli-glicólico (PGA) y PLGA^{32,33} han sido ampliamente usados para el recubrimiento de stents, como por ejemplo en los stents *BioMatrix*[®] (BioSensors) y el stent *NEVO*[®] (Cordis Corporation/Johnson& Johnson) comercializados actualmente.

Actualmente, las investigaciones se están centrando en dar un paso más y desarrollar stents metálicos que permitan una cinética de liberación del fármaco sin usar polímero, incorporando el fármaco a una superficie microporosa o nanoporosa.³⁴⁻³⁶ Otra de las vías actuales de investigación se centra en el diseño de estructuras bioabsorbibles basadas en diferentes materiales, principalmente de PLA.^{37,38}

❖ El fármaco:

Los fármacos pueden ser adicionados al polímero a través de uniones covalentes o no covalentes (interacciones iónicas o puentes de hidrogeno).^{39,40} Gracias al conocimiento de los distintos procesos biológicos involucrados en la reestenosis, los tipos de fármacos más empleados son aquellos con actividad antitrombogénica, antiproliferativos, fármacos inmunosupresores o antiinflamatorios. Entre todos son destacables aquellos con:

- *Actividad antitrombogénica:* como los stents liberadores de heparina.^{41,42}
- *Actividad antiinflamatoria:* de dexametasona^{43,44} y metilprednisolona.^{45,46}
- *Actividad antiproliferativa:* este grupo es el que mayoritariamente está siendo comercializado e incluye el uso de varios fármacos muy utilizados, como el Sirolimus (también conocido como Rapamicina) y sus derivados (Everolimus y Zotarolimus) y el Paclitaxel (Taxol®), ya que son los que han demostrado un mayor beneficio clínico siendo los fármacos predominantes en los actuales DES.^{20,47-50}

Recientemente nuestro grupo de investigación ha desarrollado un nuevo material para el uso como recubrimiento de stents basado en un sistema polimérico derivado de Triflusal (fármaco antiagregante plaquetario derivado del ácido salicílico), que incorpora además medicamentos con propiedades antiproliferativas. Dicho material se trata de un copolímero del derivado acrílico del Triflusal y de acrilato de butilo, el p(THEMA-*co*-AB), cuya estructura puede verse en la Figura 6.3. Debido a sus propiedades físico-químicas, excelente biocompatibilidad, buena adhesión a superficies y efecto antitrombogénico, este material ha sido aplicado fácilmente y con éxito comercial en el recubrimiento de stents coronarios con capacidad antitrombogénica.⁵¹⁻⁵⁴

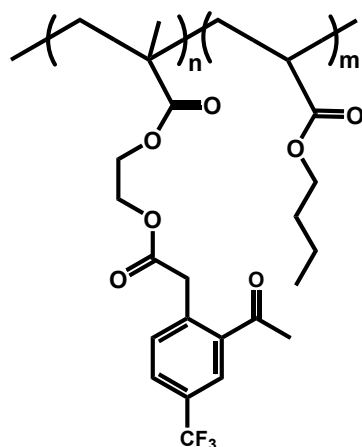


Figura 6.3. Estructura del copolímero *p*(THEMA-co-AB).

Es por ello que basándonos en el concepto del copolímero *p*(THEMA-co-AB), se planteó la opción de preparar un nuevo sistema empleando otro tipo de fármaco, esta vez de carácter antiinflamatorio, ya que como se ha comentado, son los procesos inflamatorios los desencadenantes de la reestenosis intra-stent. Así, el objetivo de este capítulo es la preparación de un nuevo material que reúna algunos de los requisitos importantes de lo que sería un polímero aplicable al recubrimiento de stents: inhibir la respuesta antiinflamatoria tras la colocación del stent y favorecer el desarrollo de células endoteliales que reparen el posible daño causado en la intervención quirúrgica. Para conseguir el objetivo final, y a partir del monómero acrílico derivado de ibuprofeno HEI, se preparan diferentes copolímeros de carácter hidrófobo cuya composición se va variando y adaptando a los resultados conseguidos a la hora de recubrir el stent. Para ello, es necesario estudiar y considerar varios factores que influyen en el comportamiento del material y lo posibilitan para dicha aplicación, como por ejemplo, el peso molecular, temperatura de transición vítrea, biocompatibilidad y liberación controlada del fármaco empleado.

6.2 SÍNTESIS DE COPOLÍMEROS HIDRÓFOBOS DERIVADOS DE IBUPROFENO

Todos los copolímeros hidrófobos portadores de ibuprofeno desarrollados en este capítulo fueron preparados mediante polimerización radical en disolución según la metodología descrita en el Capítulo 3 (apartado 3.3.2), obteniendo en todos los casos rendimientos superiores al 95%.

El monómero HEI, cuya síntesis y caracterización ya han sido descritas anteriormente en el Capítulo 4 de este trabajo, fue copolimerizado con otros monómeros de carácter hidrófobo, el MMA y AB, variando las proporciones de los mismos con el fin de conseguir un buen sistema para su aplicación en el recubrimiento de dispositivos vasculares como los stents. Después de cada síntesis y caracterización, así como de ensayos para evaluar su comportamiento al aplicarlo en el stent, se decidía si el copolímero preparado era adecuado o no, y según los resultados obtenidos, se procedía a estudiar las posibles modificaciones necesarias en la composición del copolímero para seguir mejorando su comportamiento y lograr el objetivo planteado. Para ello, se llegó a realizar una gran cantidad de trabajo ya que no sólo fueron preparados los copolímeros H1-H5 que aparecen en la Tabla 6.1, sino que se sintetizaron otras composiciones HEI-AB, HEI-MMA o HEI-MMA-AB, todos ellos sistemas cuyo comportamiento a la hora de recubrir el stent no fue el adecuado y que no serán descritos a lo largo del capítulo.

6.3 CARACTERIZACIÓN DE COPOLÍMEROS HIDRÓFOBOS DERIVADOS DE IBUPROFENO

6.3.1 Caracterización mediante técnicas espectroscópicas

Los espectros de resonancia magnética nuclear y espectroscopía infrarroja de los copolímeros preparados nos permiten comprobar la correcta preparación del copolímero, la ausencia de productos de partida y/o de reacciones secundarias así como la determinación de la concentración molar de comonómeros en el copolímero. Las Figuras 6.4, 6.5 y 6.6 muestran a modo representativo el espectro de ^1H -RMN de copolímeros hidrófobos sintetizados junto con la estructura de los mismos y la asignación de las correspondientes señales.

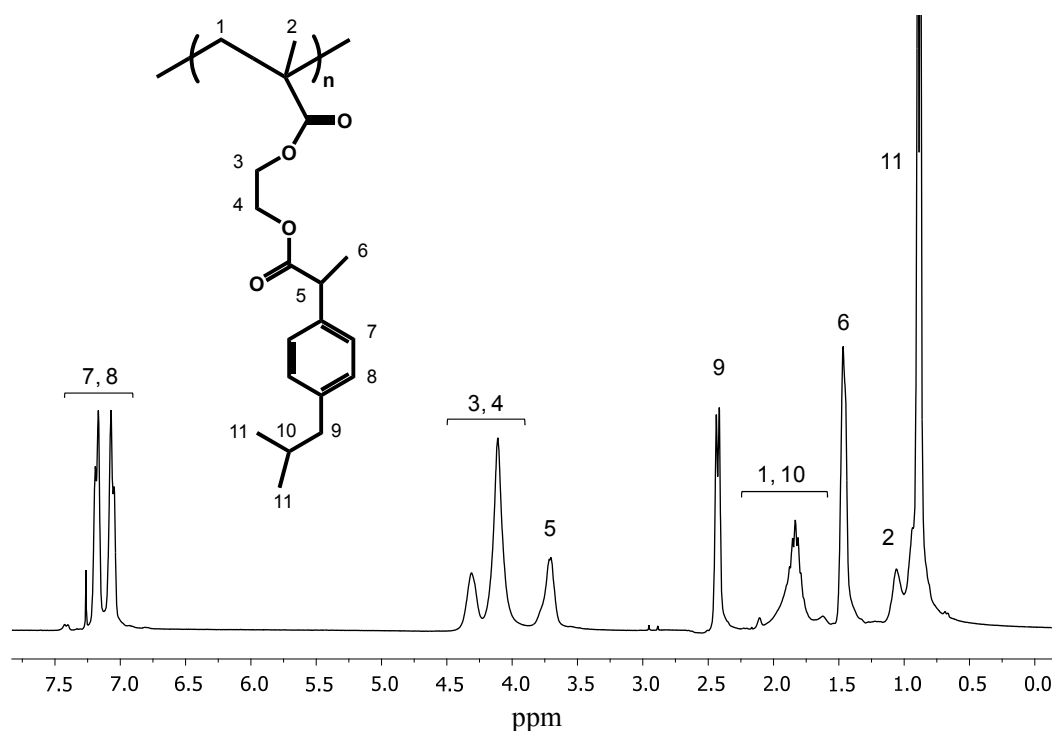


Figura 6.4. Estructura química, espectro y asignación de señales de ^1H -RMN del homopolímero *p*(HEI) en CDCl_3 .

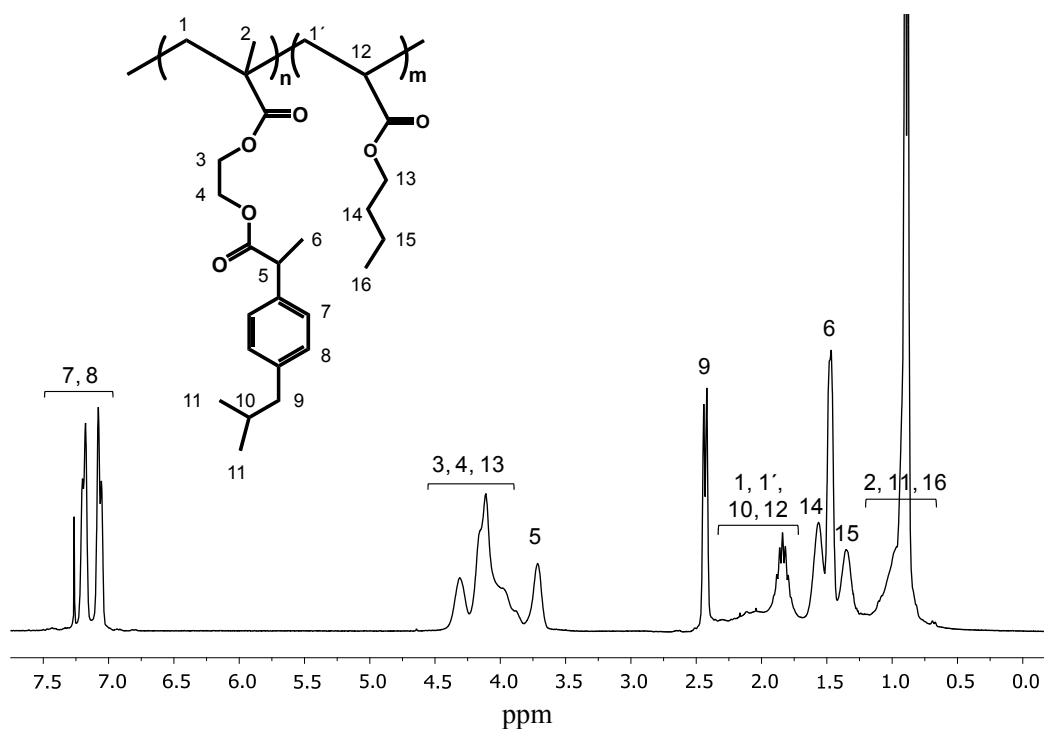


Figura 6.5. Estructura química, espectro y asignación de señales de ^1H -RMN de un copolímero $p(\text{HEI-co-AB})$ en CDCl_3 .

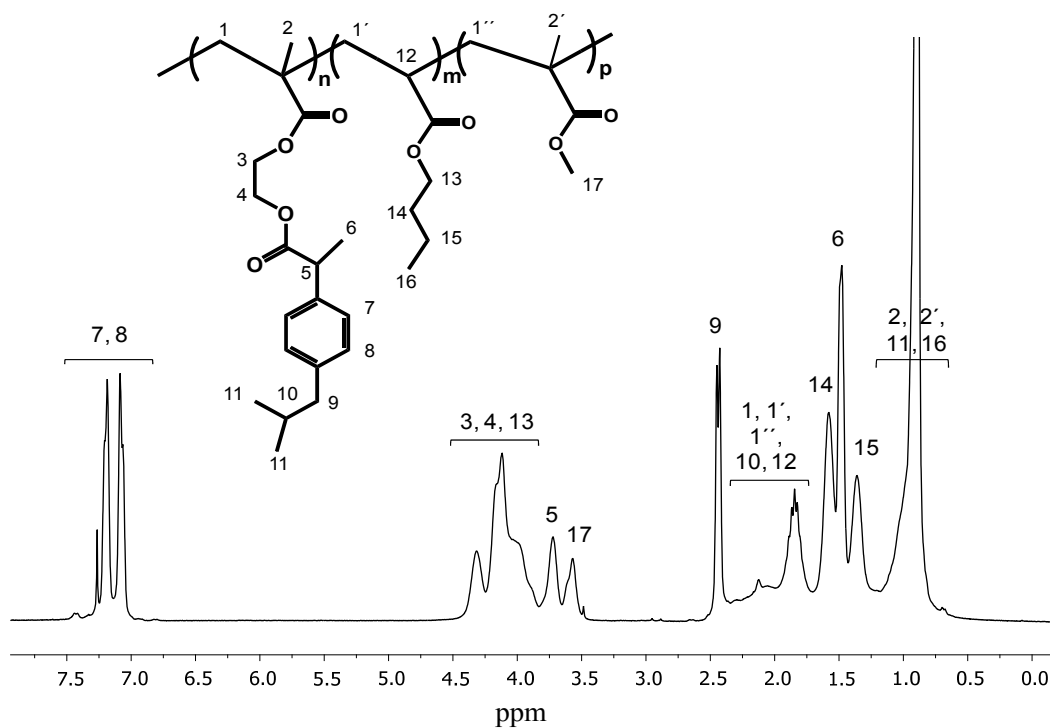


Figura 6.6. Estructura química, espectro y asignación de señales de ^1H -RMN de un copolímero $p(\text{HEI-co-AB-co-MMA})$ en CDCl_3 .

p(HEI): $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz, 25 °C) δ (ppm): 7,18 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, CH_{Ar}), 7,06 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, CH_{Ar}), 4,32 (sa, 1H, $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{-O}$), 4,11 (sa, 3H, $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{-O}$), 3,71 (sa, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-C}_{\text{Ar}}$), 2,43 (d, 2H, $J = 7,0$ Hz, $\text{ArCH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,20 - 1,65 (m, 3H, $\text{CH}_2^{(\beta)}$, $\text{ArCH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,46 (d, 3H, $J = 6,8$ Hz, $\text{ArCHCH}_3\text{-CO}$), 1,05 (sa, 3H, $\text{CH}_3^{(\alpha)}$), 0,88 (d, 6H, $J = 6,8$ Hz, $\text{ArCH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$).

p(HEI-co-AB): $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz, 25 °C) δ (ppm): 7,19 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H, CH_{Ar}), 7,07 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H, CH_{Ar}), 4,41 - 3,83 (m, 6H, $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{-O}$), $\text{CO-O-CH}_2\text{-(CH}_2)_2\text{-CH}_3$), 3,71 (sa, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-C}_{\text{Ar}}$), 2,43 (d, 2H, $J = 7,1$ Hz, $\text{ArCH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,30 - 1,70 (m, 6H, $\text{CH}_2^{(\beta)}$, $\text{CH}_2^{(\beta\text{AB})}$, $\text{CH}^{(\alpha\text{AB})}$, $\text{ArCH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,57 (sa, 2H, $\text{CO-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 1,48 (sa, 3H, $\text{ArCHCH}_3\text{-CO}$), 1,35 (sa, 2H, $\text{CO-O-(CH}_2)_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 1,15 - 0,80 (m, 12H, $\text{CO-O-(CH}_2)_3\text{-CH}_3$, $\text{CH}_3^{(\alpha)}$, $\text{ArCH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$).

p(HEI-co-AB-co-MMA): $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz, 25 °C) δ (ppm): 7,20 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, CH_{Ar}), 7,07 (d, 2H, $J = 7,6$ Hz, CH_{Ar}), 4,44 - 3,84 (m, 6H, $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{-O}$), $\text{CO-O-CH}_2\text{-(CH}_2)_2\text{-CH}_3$), 3,72 (sa, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-C}_{\text{Ar}}$), 3,57 (sa, 3H, $(\text{CH}_3)^{(\text{MMA})}$), 2,44 (d, 2H, $J = 7,1$ Hz, $\text{ArCH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,33 - 1,71 (m, 8H, $\text{CH}_2^{(\beta)}$, $\text{CH}_2^{(\beta\text{AB})}$, $\text{CH}_2^{(\beta\text{MMA})}$, $\text{CH}^{(\alpha\text{AB})}$, $\text{ArCH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,58 (sa, 2H, $\text{CO-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 1,49 (sa, 3H, $\text{ArCHCH}_3\text{-CO}$), 1,36 (sa, 3H, $\text{CO-O-(CH}_2)_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 1,20 - 0,73 (m, 15H, $\text{CO-O-(CH}_2)_3\text{-CH}_3$, $2\text{x}(\text{CH}_3^{(\alpha)})$, $\text{ArCH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$).

La Tabla 6.1 muestra la composición molar en la alimentación y en el copolímero de los sistemas H1-H5 preparados. El cálculo de las composiciones de los copolímeros se ha realizado a partir de los valores de las integrales normalizadas de señales características de cada comonomero en $^1\text{H-RMN}$. En los copolímeros p(HEI-co-AB) se ha utilizado la señal 6 (3,6 - 3,8 ppm) correspondiente a un protón del HEI y las señales 4, 5 y 13 (3,8 - 4,4 ppm) correspondiente a cuatro protones de HEI y dos protones del AB. En los copolímeros p(HEI-co-AB-co-MMA) se ha utilizado la señal 6 (3,7 - 3,9 ppm) correspondiente a un protón de HEI, la señal 17 (3,5 - 3,7 ppm) correspondiente a tres protones del MMA y las señales 4, 5 y 13 (3,9 - 4,5 ppm) correspondiente a cuatro protones de HEI y dos protones del AB. Con

los valores de dichas integrales se resuelve un sistema de ecuaciones que nos proporciona la composición molar de los correspondientes copolímeros.

	Alimentación			Copolímero		
	f(HEI)	f(AB)	f(MMA)	F(HEI)	F(AB)	F(MMA)
H1	100	-	-	100	-	-
H2	70	30	-	66	34	-
H3	60	40	-	62	38	-
H4	50	40	10	48	42	10
H5	70	10	20	65	15	20

Tabla 6.1. Composición molar en alimentación (*f*) y composición molar en el copolímero (*F*) de los sistemas preparados.

La Figura 6.7 muestra los espectros de infrarrojo ATR-FTIR registrados para dos copolímeros p(HEI-co-AB) y p(HEI-co-AB-co-MMA) representativos, apreciando las bandas correspondientes a los distintos grupos funcionales y cuya asignación se recoge en la Tabla 6.2.

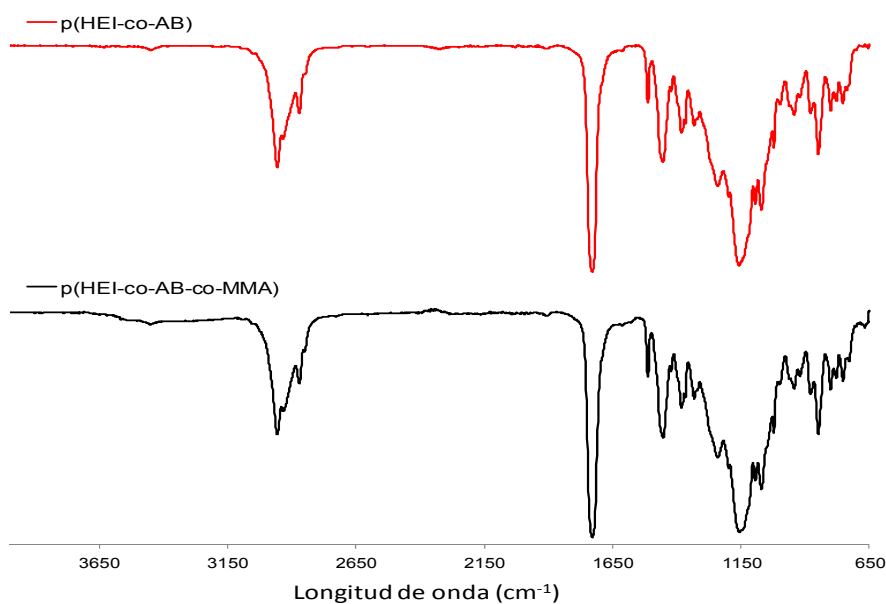


Figura 6.7. Espectros normalizados de ATR-FTIR de copolímeros hidrófobos *p*(HEI-co-AB) y *p*(HEI-co-AB-co-MMA).

Bandas características de ATR-FTIR	
Longitud de onda (cm ⁻¹)	Asignación
2950-2800	νC-H _{sp3}
1730	νC=O
1450-1460	νC=C
1150	νC-O
850	νC-H _{Ar}

Tabla 6.2. Asignación de las bandas características de infrarrojo de los copolímeros H1-H5.

6.3.2 Caracterización mediante técnicas cromatográficas

Mediante medidas de SEC y siguiendo el método descrito en el Capítulo 3 (apartado 3.4.2) se determina el M_n , M_w e IP de los copolímeros hidrófobos preparados.

Para todas las composiciones se obtienen curvas de distribución unimodales y los resultados se encuentran recogidos en la Tabla 6.3, observando la obtención de valores altos de M_n y M_w así como de IP típicos de una polimerización radicalica.

Como puede verse en la Tabla 6.3, los copolímeros H1, H3 y H5 presentan valores de pesos moleculares muy superiores al resto. Aunque no es posible definir exactamente un valor óptimo de peso molecular para el recubrimiento de stents, si está claro que éste debe ser lo bastante alto para que el material no sea ceroso o pegajoso así como para proporcionar

suficiente firmeza y adherencia para que el recubrimiento no desaparezca o se agriete durante el manejo o la expansión del stent.⁵⁵

SEC			
Copolímero	M_n	M_w	M_w/M_n
H1	45012	120887	2,6
H2	32830	63702	2,1
H3	62925	155586	2,5
H4	38815	74986	2,1
H5	54900	133410	2,4

Tabla 6.3. Pesos moleculares promedio en número (M_n), en peso (M_w) e IP (M_w/M_n) medidos por SEC de los sistemas H1-H5 preparados.

Si comparamos estos resultados con los obtenidos para los copolímeros en gradiente G37, G60 y G90 (M_w 16000-33000 e IP 1,5-2,0), podemos ver que los copolímeros H1-H5 presentan valores de peso molecular e IP mucho mayores y esperables para la técnica de polimerización radical. Sin embargo para los copolímeros en gradiente, y tal y como hemos estudiado en el Capítulo 4, la presencia del VI provoca estabilización de los macrorradicales al incorporarse a la cadena en propagación, jugando por tanto un papel importante en el peso molecular del copolímero preparado.

6.3.3 Caracterización mediante técnicas calorimétricas

El valor de temperatura de transición vítrea es clave a la hora de diseñar el material adecuado para el recubrimiento de stents, ya que influye en las propiedades mecánicas del material, como por ejemplo, en la

flexibilidad de las cadenas, adherencia al metal, buen comportamiento a la hora de expandir el stent, etc.

La determinación de la T_g de los copolímeros hidrófobos H1-H5 se realiza según el procedimiento descrito en el Capítulo 3 (apartado 3.4.3) y los resultados obtenidos se exponen en la Tabla 6.4. Se observa la obtención de un valor de T_g para la composición H1 (homopolímero p(HEI)) similar al obtenido en trabajos anteriores.⁵⁶ La presencia del monómero AB provoca un descenso considerable en el valor de T_g (T_g del p(AB)= -25 °C),⁵⁷ mientras que el monómero MMA (T_g p(MMA)= 108 °C)⁵⁸ favorece el incremento de la misma. Así, las composiciones H2, H3 y H4, en las que el AB se encuentra en una proporción molar superior al 30%, son las que presentan los valores de T_g más bajos, mientras que al disminuir la proporción del AB y emplear como tercer monómero el MMA, como es el caso del copolímero H5, se obtiene una valor de T_g más alto.

DSC	
Copolímero	T_g (°C)
H1	26
H2	6
H3	3
H4	4
H5	25

Tabla 6.4. Temperatura de transición vítrea (T_g) de los copolímeros H1-H5.

6.3.4 Recubrimiento de stents

Según el procedimiento descrito en el Capítulo 3 (apartado 3.4.5) se recubren stents vasculares con los copolímeros H1-H5 preparados y se evalúa el comportamiento de los mismos. Para ello, el balón sobre el que está montado el stent se expande y a continuación se libera para estudiar el recubrimiento gracias a la toma de imágenes mediante microscopía óptica.

Los valores de T_g influyen en el comportamiento de los polímeros a la hora de ser aplicados en el stent y especialmente en el proceso de expansión del mismo, siendo un parámetro importante a tener en cuenta porque define en cierta manera la flexibilidad del polímero y estabilidad en contacto con los fluidos biológicos. Así, los copolímeros con un valor de T_g más bajo, como los copolímeros H2, H3 y H4, mostraron un mal comportamiento al ser aplicados en el stent y tras la posterior expansión del mismo. En la Figura 6.8A vemos un stent recubierto con el copolímero H3 antes de ser expandido. Se observa un recubrimiento correcto, pero tras la expansión del stent se aprecia cómo el polímero se fractura, formando el denominado “webbing” o membranas entre los alambres del stent debido al comportamiento pegajoso del copolímero. Sin embargo, el copolímero H5 presentó un excelente resultado al ser utilizado en el recubrimiento de stents (Figura 6.8B).

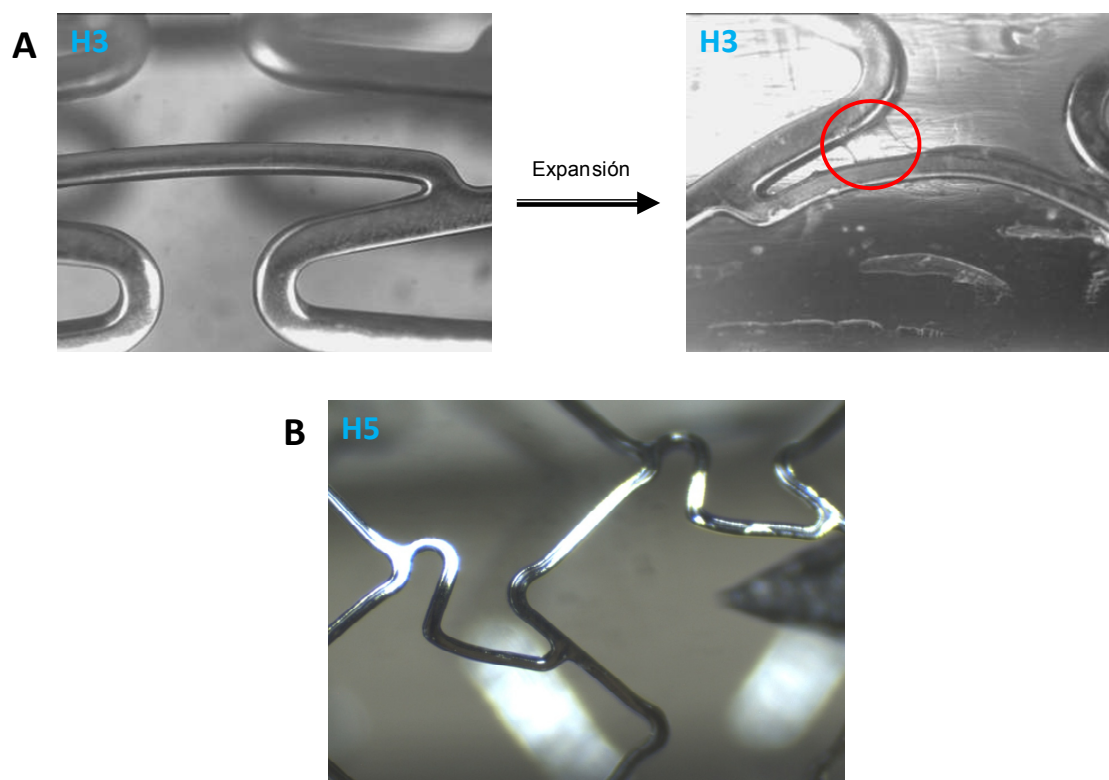


Figura 6.8. A) Stent recubierto con el polímero H3 antes y después de la expansión sobre el balón. B) Stent recubierto con el polímero H5 tras la expansión sobre el balón.

Si usamos como referencia el copolímero derivado de Triflusal, el p(HEMA-*co*-AB) 45:55, que como ya hemos mencionado en la introducción del capítulo fue preparado en trabajos anteriores en nuestro grupo de investigación y que ha dado tan buenos resultados en el recubrimiento de stents vasculares, vemos que éste presenta valores tanto de Tg como de peso molecular⁵¹ similares a los obtenidos para el copolímero H5 (Tabla 6.7). Este hecho, junto con los excelentes resultados obtenidos hasta ahora hacen del copolímero H5 un candidato prometedor para su uso como recubrimiento de stents vasculares. Es por ello por lo que se decidió seguir con una caracterización más completa (estudios celulares *in vitro* y comportamiento hidrolítico) centrada exclusivamente en este copolímero tal y como veremos en los siguientes apartados.

Copolímero	T _g (°C)	M _n	M _w	M _w /M _n
THEBA	21	52000	131000	2,5
H5	25	54900	133410	2,4

Tabla 6.7. Temperatura de transición vítrea (*T_g*), pesos moleculares promedio en número (*M_n*), en peso (*M_w*) e índice de polidispersidad (*M_w/M_n*) del copolímero THEBA *p*(THEMA-co-AB) 45:55 y del copolímero H5.

6.3.5 Comportamiento *in vitro*

6.3.5.1 Determinación del ángulo de contacto

La naturaleza de la superficie de un biomaterial, en términos de humectabilidad, ha sido descrita por varios autores⁵⁹⁻⁶¹ como uno de los parámetros más importantes a tener en cuenta en el diseño de biomateriales biocompatibles, siendo la medida del ángulo de contacto el método más comúnmente empleado para determinar esta propiedad. Conocer el valor de humectabilidad de un material que será implantando dentro de un organismo es de suma importancia dado su relación con la posible acumulación o depósito de células, plaquetas, etc., y que por tanto repercutirá en el éxito del mismo.⁶²

La energía superficial del sólido (SES) es un parámetro clave en la interacción de un material con proteínas y células, y por tanto en la hemocompatibilidad. Uno de los métodos más utilizados para su cálculo ha sido descrito por Fowkes y Owens,^{63,64} según el cual, conociendo el valor de los ángulos de contacto de diferentes líquidos con la superficie así como las energías superficiales de los mismos se calcula el valor de SES (γ_s) y sus

componentes dispersiva (γ_s^d) y polar (γ_s^p) a través de las siguientes ecuaciones,

$$\gamma_s = \gamma_s^p + \gamma_s^d$$

$$(1 + \cos \theta) \cdot \gamma_l / 2 = (\gamma_s^d \cdot \gamma_l^d)^{1/2} + (\gamma_s^p \cdot \gamma_l^p)^{1/2}$$

donde γ_s y γ_l son la energía superficial del sólido y del líquido; γ_s^d , γ_l^d , γ_s^p y γ_l^p son las componentes dispersiva y polar de la energía superficial del sólido y del líquido respectivamente y θ el ángulo de contacto.

Así mismo, la tensión crítica superficial (σ_c) es un parámetro muy usado en la estimación y predicción de la hemocompatibilidad de un material. A principios de los años setenta, Robert Baier y sus colaboradores^{65,66} desarrollaron una hipótesis que relacionaba las características superficiales y la biorreactividad según la cual, la compatibilidad de un material con la sangre se consigue minimizando la adhesión de los componentes sanguíneos y la superficie. Según Baiers, la zona de mínima bioadhesión se encuentra entre 20 y 30 mN/m de tensión crítica superficial, por lo que los materiales que presenten valores de σ_c comprendidos en este intervalo se consideran hemocompatibles. Por otro lado, y según este autor, los materiales con un valor de σ_c superior a 40 mN/m presentarán una buena bioadhesión y fuertes interacciones con el medio biológico.

Según el procedimiento descrito en el Capítulo 3 (apartado 3.4.6.1) se determinan los valores de ángulo de contacto en agua de los copolímeros H1-H5. Además, y dados los excelentes resultados que muestra el copolímero H5 como posible polímero para el recubrimiento de stents vasculares, se calculan también los ángulos de contacto en glicerina y diiodometano sobre este material para evaluar así su hemocompatibilidad.

Los resultados obtenidos se exponen en las Tablas 6.5 y 6.6. Los valores de θ_{H_2O} de los copolímeros H1-H5 son altos, tal y como es de esperar teniendo en cuenta el carácter hidrófobo de los monómeros que los forman.

Ángulo de contacto	
Copolímero	θ_{H_2O}
H1	$93,7 \pm 1,3$
H2	$91,6 \pm 1,2$
H3	$83,4 \pm 0,9$
H4	$80,2 \pm 1,5$
H5	$84,0 \pm 0,5$

Tabla 6.5. *Ángulos de contacto en agua (θ_{H_2O}) obtenidos para los copolímeros H1-H5.*

En la Tabla 6.6 se exponen los valores de energía superficial de sólido (SES) y sus componentes polar y dispersiva obtenidos según el método de Fowkes y Owens a partir de las medidas de ángulo de contacto en agua, glicerina y diiodometano sobre el copolímero H5. El cálculo de σ_c se realizó de acuerdo con el método de Zisman⁶⁷ a partir de los valores de tensión superficial de los diferentes líquidos y los ángulos de contacto de la superficie con los mismos. Al representar el coseno del ángulo de contacto (θ) en función de la tensión superficial de los líquidos utilizados y extrapolando la recta resultante a $\cos \theta = 1$ se obtiene el valor de σ_c . Según bibliografía,⁶⁸ para muestras que presenten grupos funcionales susceptibles de formar puentes de hidrógeno con la superficie no es conveniente considerar el ángulo de contacto con agua para el cálculo de este parámetro, por lo que para el caso del copolímero H5 portador de ibuprofeno se emplearon únicamente las medidas de los ángulo de contacto y tensiones superficiales

de glicerina y diiodometano. La tensión crítica de superficie obtenida para este polímero fue de 32,4 mN/m, valor que se encuentra cercano al rango de mínima bioadhesión y máxima hemocompatibilidad establecido por Baier (entre 20 y 30 mN/m),⁶⁵ siendo por tanto otro importante resultado a sumar a los ya obtenidos para este copolímero con vista a su posible aplicación como recubrimiento de stents.

	Ángulo de contacto			σ_c (mN/m)	SES (mN/m)		
Copolímero	θ_{agua}	$\theta_{\text{diiodometano}}$	$\theta_{\text{glicerina}}$		γ_s^p	γ_s^d	γ_s
H5	84,0 ± 0,5	53,3 ± 1,2	75,0 ± 0,7	32,4	3,5	30,0	33,5

Tabla 6.6. Ángulos de contacto en agua (θ_{agua}), diiodometano ($\theta_{\text{diiodometano}}$) y glicerina ($\theta_{\text{glicerina}}$), así como de energía superficial del sólido (γ_s), componente polar (γ_s^p) y dispersiva (γ_s^d) y valor de tensión crítica superficial (σ_c) obtenidos para el copolímero H5 p(HEI-co-AB-co-MMA) 70:10:20.

6.3.5.2 Liberación de ibuprofeno

Dada la presencia del enlace éster hidrolizable que une el ibuprofeno al esqueleto polimérico, se lleva a cabo el estudio de liberación *in vitro* del fármaco a pH 7 y 10 según el procedimiento descrito en el Capítulo 3 (apartado 3.4.6.2).

Los perfiles de liberación de ibuprofeno de la composición H5 se muestran en la Figura 6.9, observándose valores de liberación bajos tras más de tres meses de estudio. El carácter hidrófobo del material provoca un bajo grado de hidratación de la matriz polimérica, dificultando así el acceso de las moléculas de agua en su seno para producir la hidrólisis del fármaco.

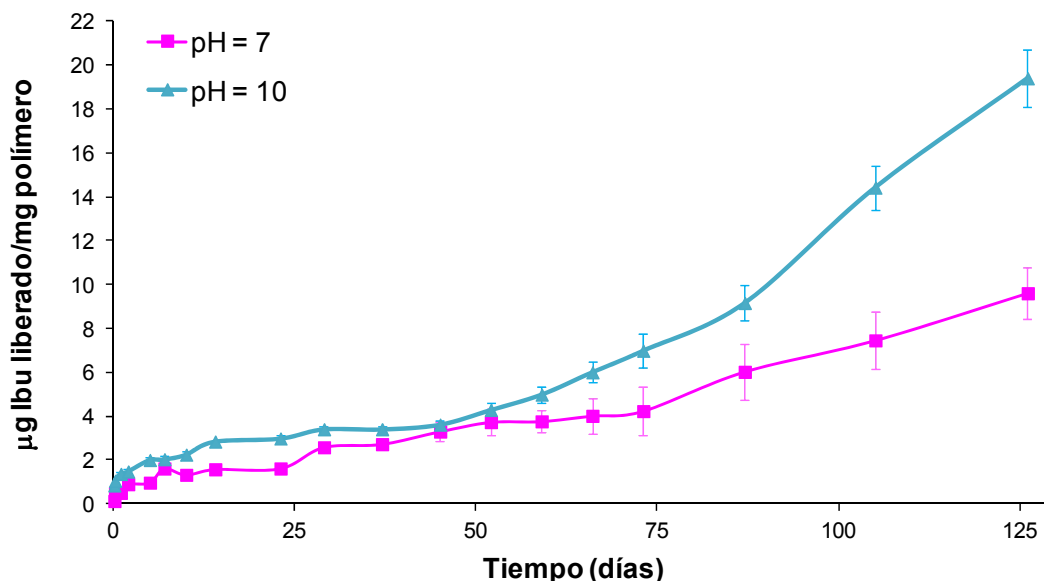


Figura 6.9. Perfiles de liberación de ibuprofeno a pH 7 y pH 10 del copolímero H5 $p(HEI-co-AB-co-MMA)$ 70:10:20.

En la Figura 6.9 se puede observar que la cantidad de fármaco liberado depende del pH del medio, de forma que como a pH básico está favorecida la hidrólisis del enlace éster que une el fármaco a la cadena polimérica, la cantidad de ibuprofeno liberado a pH 10 es mayor que la alcanzada a pH 7.

En este caso también puede ser aplicado el mecanismo tipo “en cremallera” (unzipping mechanism) ya explicado en capítulos anteriores, ya que como consecuencia de la hidrólisis del fármaco van quedando grupos hidroxilos libres (del grupo HEMA) de carácter más polar, facilitando así el acceso de moléculas de agua y favoreciendo la liberación de ibuprofeno por el aumento de la hidrofilia del sistema.

La estabilidad del enlace éster entre la cadena polimérica y fármaco puede ser un efecto favorable a la hora de preparar formulaciones que precisen cinéticas lentas de liberación, como es el caso de recubrimientos de dispositivos vasculares con actividad a largo plazo. De todas formas, como

ya hemos comentado, hay que tener en cuenta que siempre es arriesgado extrapolar los resultados *in vitro* al verdadero comportamiento *in vivo*, donde la acción hidrolítica de las enzimas juega un papel importante favoreciendo la hidrólisis del fármaco.

Si comparamos los perfiles de liberación del copolímero hidrófobo H5 con los copolímeros en gradiente descritos en el Capítulo 4, y para un porcentaje molar similar de ibuprofeno en el copolímero (60-65%), como son el copolímeros H5 (p(HEI-co-AB-co-MMA) 70:10:20) y el copolímero en gradiente G60 (p(HEI-co-VI) 60:40), vemos en la Tabla 6.8 cómo el copolímero G60, gracias a las unidades de VI de naturaleza hidrófila intercaladas a lo largo de la cadena macromolecular, alcanza unos valores de liberación superiores y en menor tiempo en ambos medios tamponados a los alcanzados por el copolímero H5, ya que en ese caso se ve favorecida el aumento de la hidrofilia del sistema y la entrada de agua para producir la hidrólisis del fármaco.

	G60 (t=42 días)	H5 (t=45 días)	H5 (t=125días)
pH = 7	29,3	3,3	9,6
pH = 10	33,1	3,6	19,4

Tabla 6.8. Cantidad de ibuprofeno liberada (μg Ibu/mg polímero) por los copolímeros G60 y H5 en medios tamponados a pH 7 y 10.

6.3.6 Estudios de biocompatibilidad *in vitro*

Estos estudios fueron realizados utilizando células endoteliales y fibroblastos para poder establecer un análisis comparativo entre ambos tipos celulares, ya que para la aplicación de los copolímeros en DES es

preferible el crecimiento de células endoteliales que recubran y reparen el vaso sanguíneo después de la implantación del stent.

6.3.6.1 Evaluación de citotoxicidad. Ensayo MTT

Mediante el ensayo MTT y según el método descrito en el Capítulo 3 (apartado 6.4.7.1) se analiza la viabilidad celular en presencia de los extractos procedentes del copolímero H5 en estudio.

En la Figuras 6.10 y 6.11 se muestran los resultados obtenidos de viabilidad de células endoteliales y de fibroblastos respectivamente, observando en ambos casos una elevada viabilidad celular relativa respecto al control (TMX), incluso mayor y estadísticamente diferente ($p < 0,05$) a la exhibida por el control en algunos casos, por lo que se puede decir que la muestra H5 no es citotóxica. En el caso de las pruebas realizadas con fibroblastos se aprecia un descenso de la viabilidad celular relativa a los 7 días del cultivo, pero superior al 70%, límite por debajo del cual la norma ISO 10993-5 considera tóxicos a los materiales.⁶⁹ En el caso de células endoteliales, no se observa este descenso de viabilidad con el tiempo, hecho muy favorecedor considerando la posible aplicación del material en estudio.

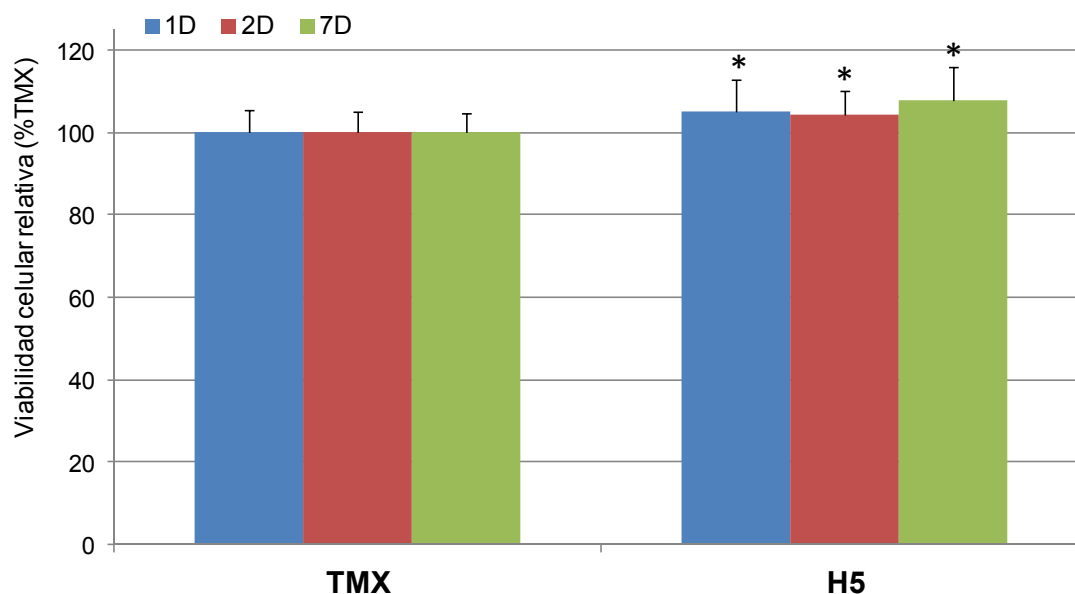


Figura 6.10. Resultados de citotoxicidad del ensayo MTT de la muestra control (TMX) y el copolímero H5 realizado con células endoteliales. Se representa la media \pm error estándar de la media ($n=16$) y las diferencias significativas obtenidas en los ANOVA frente al TMX (*: $p<0,05$).

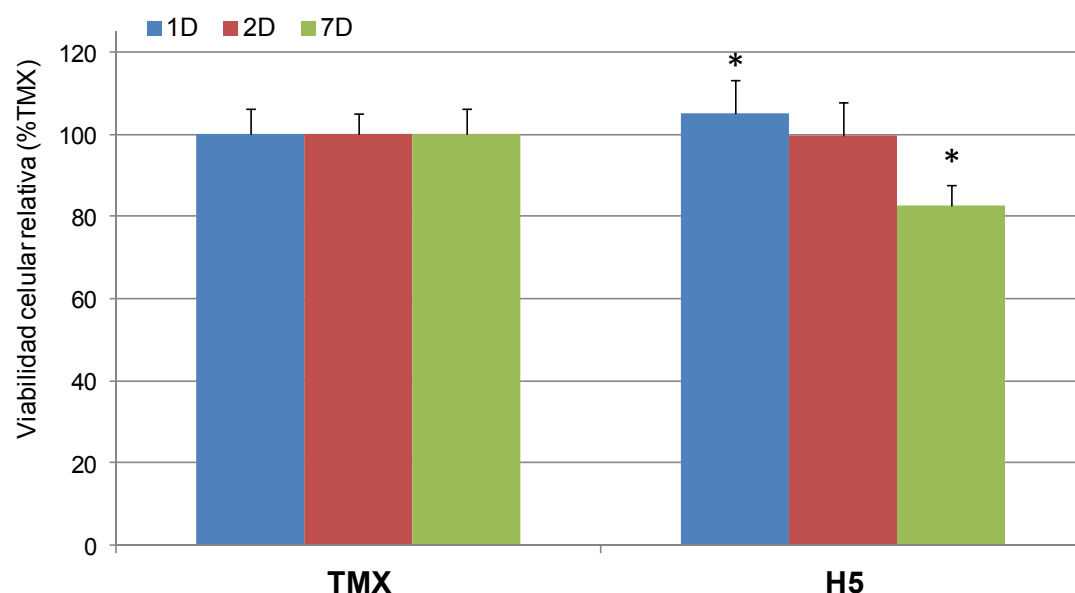


Figura 6.11. Resultados de citotoxicidad del ensayo MTT de la muestra control (TMX) y copolímero H5 realizado con fibroblastos. Se representa la media \pm error estándar de la media ($n=16$) y las diferencias significativas obtenidas en los ANOVA frente al TMX (*: $p<0,05$).

6.3.6.2 Evaluación de la adhesión y proliferación celular. Ensayo Alamar Blue

Mediante el ensayo Alamar Blue y según el método descrito en el Capítulo 3 (apartado 3.4.7.2) se analiza la adhesión y proliferación celular sobre superficies recubiertas por el copolímero H5.

En este caso se observa también una elevada viabilidad celular relativa respecto al control (TMX) tanto para el caso de células endoteliales como de fibroblastos (Figuras 6.12 y 6.13). En ambos casos se aprecia cómo la adhesión de las células sobre el material va aumentando con el tiempo, llegando a ser el desarrollo y la proliferación sobre la superficie recubierta con el copolímero H5 similar al del control TMX. Los resultados obtenidos con las dos líneas celulares son muy similares, por lo que no es posible obtener una conclusión sobre la diferencia entre los dos tipos.

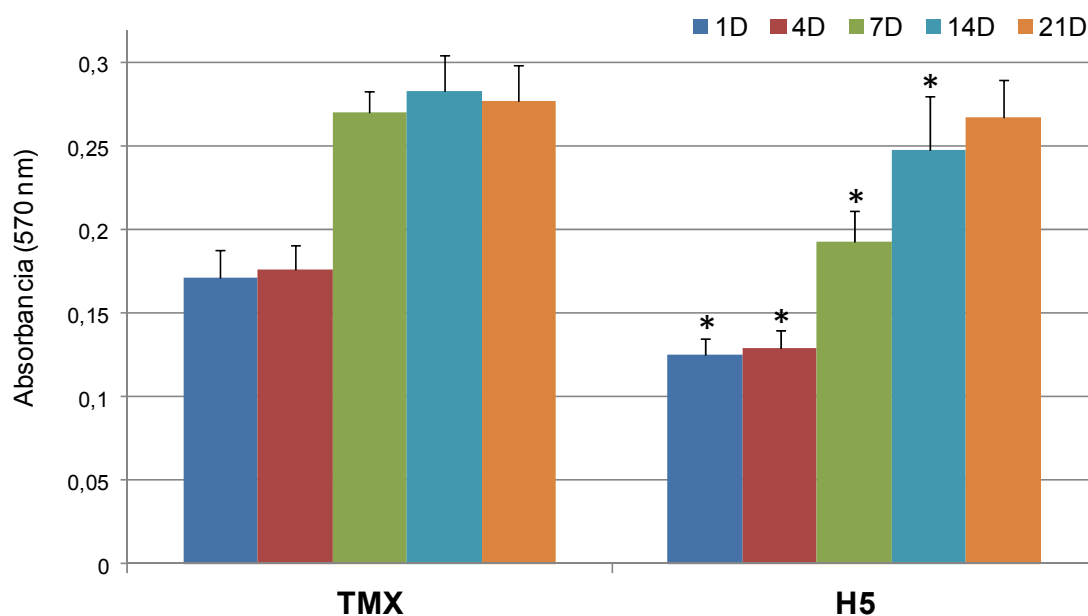


Figura 6.12. Resultados del ensayo Alamar Blue de la muestra control (TMX) y el copolímero H5 realizado con células endoteliales. Se representa la media \pm error estándar de la media ($n=16$) y las diferencias significativas obtenidas en los ANOVA frente al TMX (*: $p<0,05$).

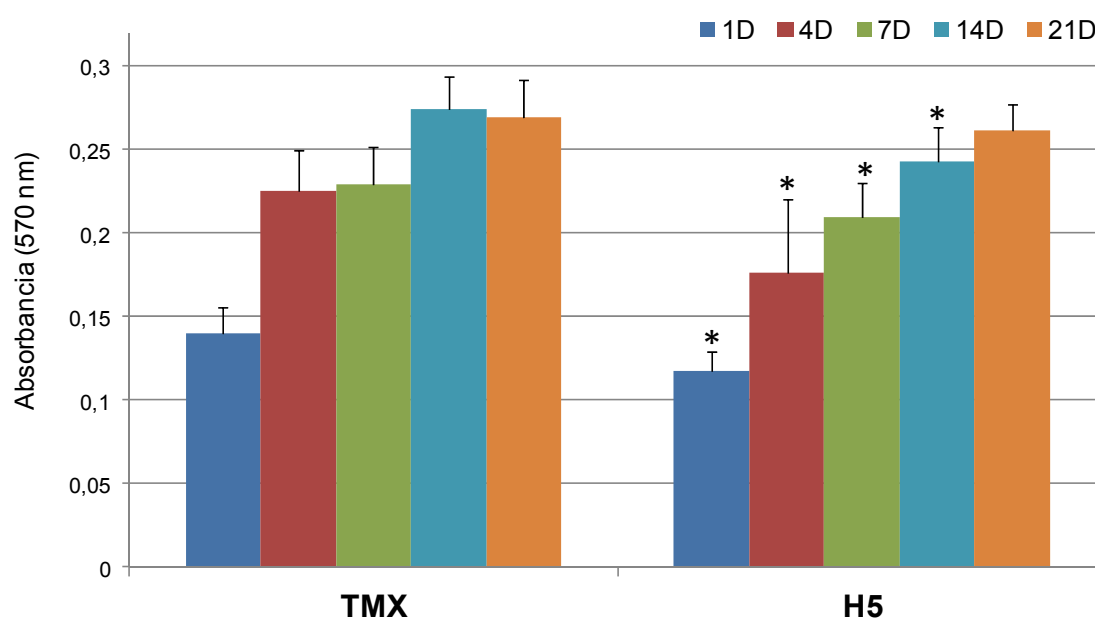


Figura 6.13. Resultados del ensayo Alamar Blue de la muestra control (TMX) y el copolímero H5 realizado con fibroblastos. Se representa la media \pm error estándar de la media ($n=16$) y las diferencias significativas obtenidas en los ANOVA frente al TMX (*: $p<0,05$).

6.3.6.3 Morfología celular, proliferación y adhesión celular por microscopía electrónica de barrido

Las imágenes obtenidas por SEM nos muestran unos resultados acordes a los obtenidos en los ensayos MTT y Alamar Blue, es decir, una elevada viabilidad celular y un aumento progresivo de la proliferación y adhesión celular con el tiempo. Así, tanto en el estudio con células endoteliales como con fibroblastos se observa que las muestras presentan una morfología normal y una mayor proliferación y adhesión celular a los 7 días (Figuras 6.14 y 6.15).

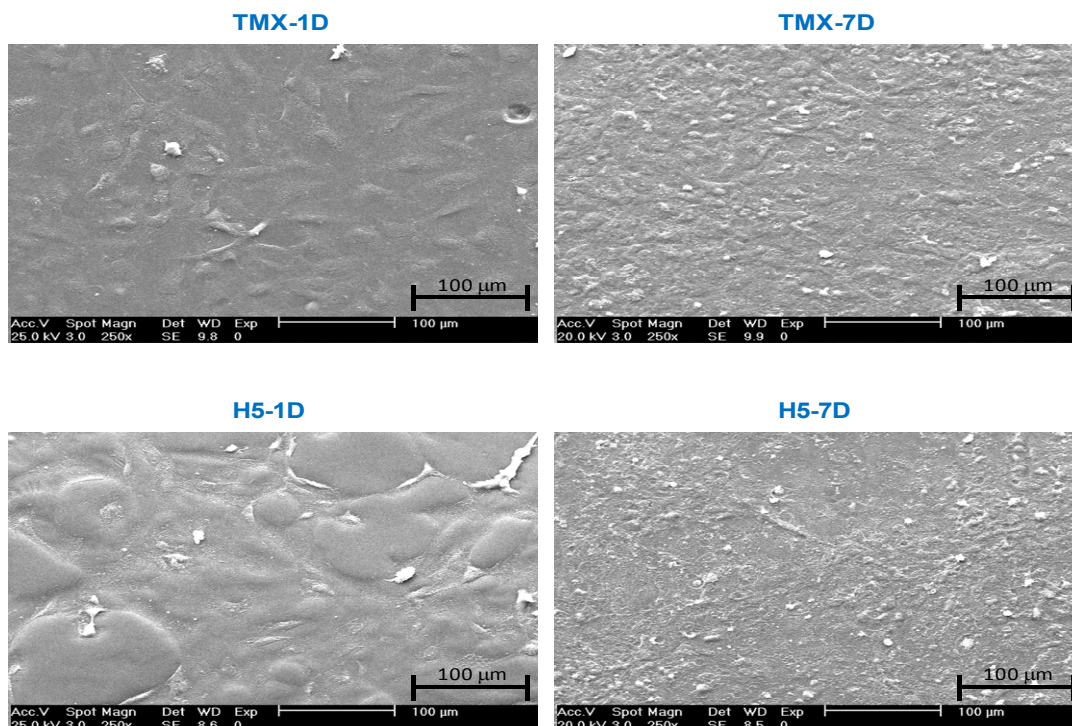


Figura 6.14. Imágenes de SEM de la proliferación de células endoteliales sobre la superficie control (TMX) y recubierta por el copolímero H5.

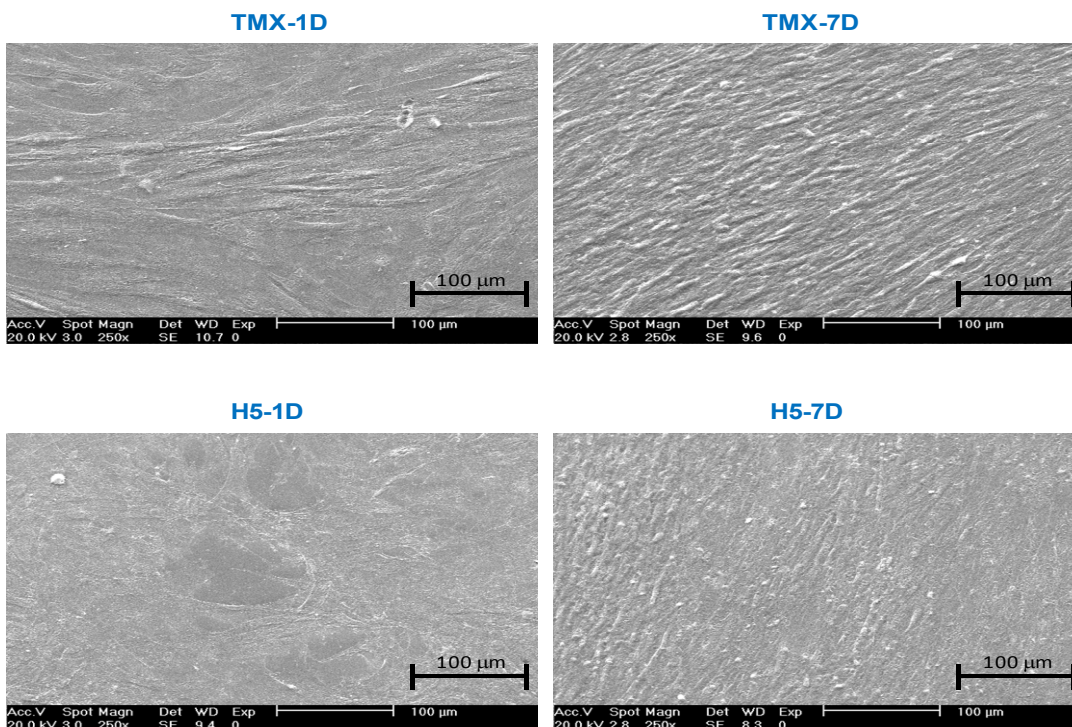


Figura 6.15. Imágenes de SEM de la proliferación de fibroblastos sobre la superficie control (TMX) y recubierta por el copolímero H5.

Como ya hemos mencionado en la introducción de este capítulo, el crecimiento de células endoteliales sobre superficies recubiertas con el copolímero H5 es un resultado importante ya que favorece la reparación del vaso sanguíneo tras la implantación del stent. Este hecho, junto con el carácter antiinflamatorio del material gracias a la liberación controlada de ibuprofeno, hacen que el copolímero H5 pueda considerarse como una excelente alternativa para su uso en el recubrimiento de stent vasculares ya que su acción podría inhibir diferentes procesos implicados en el desarrollo de reestenosis así como otras complicaciones asociadas a la implantación del stent.

6.4 BIBLIOGRAFÍA

¹ World Health Organization. *Cardiovascular Disease: Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control*. Geneva, Switzerland, **2012**.

² Laslett, L.J.; Alagona, P.; Clark, B.A.; Drozda, J.P.; Saldivar, F.; Wilson, S.R.; Poe, C.; Hart, M. *Journal of the American College of Cardiology*, **2012**, *60*, 1-49.

³ Fuster, V.; Badimon, L.; Badimon, J.J.; Chesebro, J.H. *New England Journal of Medicine*, **1992**, *326*, 262-250.

⁴ Bayod, C.; Villarroel, M.T.; Pérez Lorenz, J.B; Puzo, J. *Medicine (Spain)*, **2013**, *11*, 2283-2295.

⁵ Grüentzig A. *New England Journal of Medicine*, **1979**, *301*, 61-69.

- ⁶ Sigwart, U.; Puel, J.; Mirkovitch, V.; Joffre, F.; Kappenberger, L. *New England Journal of Medicine*, **1987**, *316*, 701-706.
- ⁷ Costa, M.A.; Simon, D.I. *Circulation*, **2005**, *11*, 2257-2273.
- ⁸ Sigwart, U.; Urban, P.; Golf, S.; Kaufmann, U.; Imbert, C.; Fischer, A.; Kappenberger, L. *Circulation*, **1988**, *78*, 1121-1127.
- ⁹ Burt, H.M.; Hunter, W.L. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2006**, *58*, 345-346.
- ¹⁰ Serruys, P.W.; De Jaegere, P.; Kiemeneij, F.; Macaya, C.; Rutsch, W.; Materne, P. *New England Journal of Medicine*, **1994**, *331*, 489-495.
- ¹¹ Farb, A.; Sangiorgi, G.; Carter, A.J.; Walley, V.M.; Edwards, W.D.; Schwartz, R.S.; Virmani R. *Circulation*, **1999**, *99*, 44-52.
- ¹² Tsuchida, P.W.S.; Bruining, N.; Dudek, D. *American Journal of Cardiology*, **2007**, *99*, 607-615.
- ¹³ Garg, S.; Serruys, P.W. *Journal of the American College of Cardiology*, **2010**, *56*, S1-S42.
- ¹⁴ Sharkawi, T.; Leyni-Barbaz, D.; Chikh, N. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, **2005**, *20*, 153-168.
- ¹⁵ Schawartz, R.; Serruys, P.; Holmes, D.R. *Journal of the American College of Cardiology*, **1998**, *32*, 2087-2094.
- ¹⁶ Mintz, G.S.; Hoffmann, R.; Mehran, R.; Pichard, A.D.; Kent, K.M.; Leon, M.B. *American Journal of Cardiology*, **1998**, *81*, 7-13.
- ¹⁷ Shin, H.S.; Park, K.; Ji-Heung, K. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, **2009**, *24*, 316-328.

- ¹⁸ Holmes, D.R.; Teirstein, P.; Satler, L. *Journal of the American Medical Association*, **2006**, *295*, 1264-1273.
- ¹⁹ Stone, G.W.; Ellis, S.G.; O'Shaughnessy, C.D. *Journal of the American Medical Association*, **2006**, *295*, 1253-1263.
- ²⁰ Puranik, A.S.; Dawson, E.R.; Peppas, N.A. *International Journal of Pharmaceutics*, **2013**, *411*, 665-679.
- ²¹ Sousa, J.E.; Serruys, P.; Costa, M.A. *Circulation*, **2003**, *107*, 2274-2279.
- ²² Sousa, J.E.; Serruys, P.; Costa, M.A. *Circulation*, **2003**, *107*, 2383-2389.
- ²³ Sousa, J.E.; Costa, M.A.; Abizaid, A.; Abizaid, A.S.; Feres, F.; Pinto, I.M. *Circulation*, **2001**, *103*, 192-195.
- ²⁴ Cohen, J.H.; Balss, K.M.; Akerman-Revis, E.; Inderbitzen, M.; Lisk, J.; Marathe, A.; O'Brien, R.; Pottinger-Cooper, E.; Rudd, W.; Wendel, C.; Papandreou, G.; Maryanoff, C.A. *Analytical Methods*, **2012**, *4*, 3961-3967.
- ²⁵ Chin-Quee, S.L.; Hsu, S.H.; Nguyen-Ehrenreich, K.L.; Tai, J.T.; Abraham, G.M.; Pacetti, S.D.; Chan, Y.F.; Nakazawa, G.; Kolodgie, F.D.; Virmani, R.; Ding, N.N.; Coleman, L.A. *Biomaterials*, **2010**, *31*, 648-657.
- ²⁶ Lewis, A.L.; Tolhurst, L.A.; Stratford, P.W. *Biomaterials*, **2002**, *23*, 1697-1706.
- ²⁷ Zhu, J.Z.; Xiong, X.W.; Du, R.; Jing, Y.J.; Ying, Y.; Fan, X.M.; Zhu, T.Q.; Zhang, R.Y. *Biomaterials*, **2012**, *33*, 8204-8212.
- ²⁸ Boden, M.; Richard, R.; Schwarz, M.C.; Kangas, S.; Huibregtse, B.; Barry, J.J. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **2009**, *20*, 1553-1562.

- ²⁹ Grube, E.; Sonoda, S.; Ikeno, F.; Honda, Y.; Kar, S.; Chan, C. *Circulation*, **2004**, *109*, 2168-2171.
- ³⁰ Stefanini, G.G.; Kalesan, B.; Serruys, P.W.; Heg, D.; Buszman, P.; Linke, A. *Lancet*, **2011**, *378*, 1940-1948.
- ³¹ Finn, A.V.; Nakazawa, G.; Joner, M.; Kolodgie, F.D.; Mont, E.K.; Gold, H.K. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, **2007**, *27*, 1500-1510.
- ³² Abizaid, A.; Ribamar-Costa, J. *Circulation*, **2010**, *3*, 384-393.
- ³³ Räber, L.; Windecker, S. *Cardiovascular Therapeutics*, **2011**, *29*, 176-189.
- ³⁴ Khan, W.; Farah, S.; Domb, A.J. *Journal of Controlled Release*, **2012**, *161*, 703-712.
- ³⁵ Tada, N.; Virmani, R.; Grant, G.; Bartlett, L.; Black, A.; Clavijo, C.; Christians, U.; Betts, R.; Savage, D.; Su, S.H.; Shulze, J.; Kar, S. *Circulation: Cardiovascular Interventions*, **2010**, *3*, 174-183.
- ³⁶ Stiermaier, T.; Heinz, A.; Schloma, D.; Schuler, G.; Thiele, H.; Desch, S. *Journal of the American College of Cardiology*, **2013**, *6*, 1650-1655.
- ³⁷ Shen, L.; Wu, Y.; Wang, Q.; Ge, L.; Hu, X.; Xie, J.; Qiann, J.; Ge, J. *European Heart Journal*, **2013**, *34*, 20-25
- ³⁸ Maulik, J.; Sanjay, S.; Nidhi, S. *Acta Pharmaceutica*, **2012**, *62*, 473-496.
- ³⁹ Fattori, R.; Piva, T. *Lancet*, **2003**, *361*, 247-249.
- ⁴⁰ Whelan, D.; Van Beusekom, H.; Van der Giessen, W. *Seminars in Interventional Cardiology*, **1998**, *3*, 127-131.

- ⁴¹ Meng, S.; Liu, Z.; Shen, L.; Guo, Z.; Chou, L.L.; Zhong, W.; Du, Q.; Ge, J. *Biomaterials*, **2009**, *30*, 2276-2283.
- ⁴² Haude, M.; Konorza, T.; Kalnins, U.; Erglis, A.; Saunamaki, K.; Glogar, H.D.; Grube, E.; Gil, R.; Serra, A.; Richardt, H.G.; Sick, P.; Erbel, R. *Circulation*, **2003**, *107*, 1265-1270.
- ⁴³ Raval, A.; Parikh, J.; Engineer, C. *Chemical Engineering and Design*, **2010**, *88*, 1479-1484.
- ⁴⁴ Lincoff, A.M.; Furst, J.G.; Ellis, S.G.; Tuch, R.J.; Topol, E.J. *Journal of the American College of Cardiology*, **1997**, *29*, 808-816.
- ⁴⁵ Huang, Y.; Liu, X.; Wang, L.; Verbeken, E.; Li, S.; De Scheerder, I. *International Journal of Cardiovascular Interventions*, **2003**, *5*, 166-171.
- ⁴⁶ Wang, L.; Salu, K.; Verbeken, E.; Bosmans, J.; Van de Werf, F.; De Scheerder, I.; Huang, Y. *Coronary Artery Disease*, **2005**, *16*, 237-243.
- ⁴⁷ Grube, E.; Buellesfeld, L. *Reviews in Cardiovascular Medicine*, **2004**, *5*, S3-S8.
- ⁴⁸ Abizaid, A. *Journal of Vascular Health and Risk Management*, **2007**, *3*, 191-201.
- ⁴⁹ Widimsky, P.; Motovska, Z.; Belardi, J.; Serruys, P.; Silber, S.; Windecker, S.; Neumann, F.J. *International Journal of Cardiology*, **2013**, *168*, 3522-3526.
- ⁵⁰ Kraitzer, A.; Zilberman, M. *Advanced Engineering Materials*, **2012**, *14*, B294-B310.

- ⁵¹ Rodríguez, G.; Fernández-Gutiérrez, M.; Parra, J.; López-Bravo, A.; Honduvilla, N.G.; Buján, J.; Molina, M.; Duocastella, L.; San Román, J. *Biomacromolecules*, **2010**, *11*, 2740-2747.
- ⁵² Rodríguez, G.; Gallardo, A.; Fernández, M.; Rebuelta, M.; Buján, J.; Bellón, J.M.; García-Honduvilla, N.; Escudero, C.; San Román, J. *Macromolecular Bioscience*, **2004**, *4*, 579-586.
- ⁵³ Gallardo, A.; Rodríguez, G.; Fernández, M.; Aguilar, M.R.; San Román, J. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, **2004**, *15*, 917-928.
- ⁵⁴ Rodríguez, G.; Gallardo, A.; San Román, J.; Rebuelta, M.; Bermejo, P.; Buján, J.; Bellón, J.M.; Honduvilla, N.G.; Escudero, C. *Journal of Materials Science, Materials in Medicine*, **1999**, *10*, 873-878.
- ⁵⁵ Venkatraman, S.; Poh, T.L.; Vinalia, T.; Mak, K.H.; Boey, F. *Biomaterials*, **2003**, *24*, 2105-2111.
- ⁵⁶ Parejo, C.; Gallardo, A.; San Román, J. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **1998**, *9*, 803-809.
- ⁵⁷ Walsh, D.J.; Cheng, G.L. *Polymer*, **1984**, *25*, 495-499.
- ⁵⁸ Fowler, M.E.; Barlow, J.W.; Paul, D.R. *Polymer*, **1987**, *28*, 1177-1184.
- ⁵⁹ Hou, R.; Wu, L.; Wang, J.; Huang, N. *Applied Surface Science*, **2010**, *256*, 5000-5005.
- ⁶⁰ Hezi-Yamit, A.; Sullivan, C.; Wong, J.; David, L.; Chen, M.; Cheng, P.; Shumaker, D.; Wilcox, J.N.; Udipi, K. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **2009**, *90*, 133-141.
- ⁶¹ Baier, R.E.; Meyer, A.E.; Natiella, J.R.; Natiella, R.R.; Carter, J.M. *Journal of Biomedical Materials Research*, **1984**, *18*, 337-355.

- ⁶² Black, B. *Biological performance of materials: fundamentals of biocompatibility*. Marcel Dekker. **1999**. Nueva York.
- ⁶³ Fowkes, F.M. *Industrial and Engineering Chemistry*, **1964**, *56*, 40-53.
- ⁶⁴ Owens, D.K. *Journal of Applied Polymer Science*, **1969**, *13*, 1741-1747.
- ⁶⁵ Baier, R.E. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, **1972**, *48*, 257-272.
- ⁶⁶ Baier, R.E.; Meyer A.E. *Surface energetics and biological adhesion*. Plenum Press. **1985**. Nueva York.
- ⁶⁷ Zisman, W.A. *Relation of equilibrium contact angle to liquid and solid constitution*. American Chemical Society. Vol. 43. **1964**. Washington D.C.
- ⁶⁸ Garbassi, F; Morra, M.; Occhiello, E. *Polymer Surfaces, from physics to technology*. John Wiley & Sons. **1994**. Nueva York.
- ⁶⁹ ISO 10993:5 standard. *Biological Evaluation of Medical Devices, Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*, **2009**.

Capítulo 7

RESUMEN GENERAL Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha abordado la preparación de nuevos copolímeros portadores de ibuprofeno con actividad antiinflamatoria. Para ello se ha tomado como molécula de partida un derivado metacrílico de ibuprofeno denominado HEI, sintetizado a partir del metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) y el fármaco, de forma que se consigue la incorporación del fármaco a cadenas macromoleculares como residuo lateral hidrolizable a través de un enlace tipo éster. La síntesis de este monómero ha sido realizada por un método diferente al empleado en trabajos anteriores, siendo el procedimiento desarrollado en este trabajo más sencillo y más efectivo, basado en una reacción de tipo Steglich en la que la formación del enlace éster se consigue por reacción del grupo ácido carboxílico del ibuprofeno con el alcohol del HEMA y usando DCC como catalizador y DMAP como activador de la reacción. La caracterización mediante técnicas espectroscópicas ha confirmado la correcta preparación de dicho monómero. A partir del monómero HEI se han obtenido tres tipos de sistemas cuyo esquema se representa en la Figura 7.1.

Por un lado se han preparado sistemas poliméricos biocompatibles derivados de imidazol y portadores del fármaco. La diferente reactividad del monómero HEI con respecto al monómero 1-vinilimidazol (VI), da lugar a la formación de cadenas poliméricas con secuencias ricas en el monómero más reactivo (HEI) seguidas de secuencias ricas en el otro monómero (VI). Como consecuencia de esta distribución y de los caracteres hidrófobos e hidrófilos del ibuprofeno e imidazol respectivamente, estos sistemas poliméricos presentan un carácter anfifílico responsable de la formación en medio acuoso de micelas nanométricas mediante procesos de autoensamblaje. Estos compuestos poliméricos pueden actuar como vehículos para la liberación del fármaco de una forma vectorizada, modulada y/o localizada mediante la hidrólisis de la cadena polimérica. Además, poseen la capacidad de reducir o incluso inhibir la actividad de las MMP mediante complejación de metales como zinc a través de los grupos imidazol. Por tanto, los sistemas

poliméricos descritos son capaces de combinar en un solo material o formulación dos estrategias para el tratamiento de procesos inflamatorios: inhibición de MMP por la formación de complejos metálicos y administración controlada y vectorizada del AINE.

Por otro lado se han preparado mediante polimerización radical copolímeros hidrófobos portadores de ibuprofeno con otros monómeros también de carácter hidrófobo como son el acrilato de butilo (AB) y el metacrilato de metilo (MMA), variando la presencia y proporción de ellos con el objetivo de obtener un buen material para ser usado como sistema de recubrimiento de stents vasculares. Tras una completa caracterización de los distintos materiales los resultados han mostrado un copolímero, el p(HEI-co-AB-co-MMA) 70:10:20, como aquel que presenta un mejor comportamiento para el objetivo planteado en este trabajo. Los estudios celulares muestran un bajo grado de citotoxicidad y buena adhesión de células endoteliales y fibroblastos.

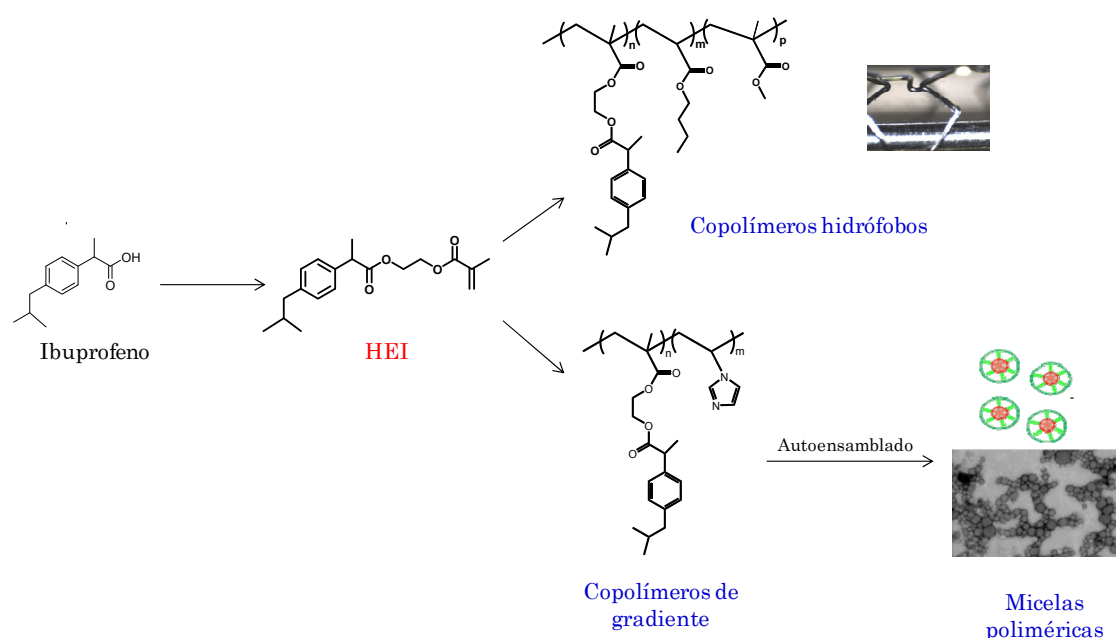


Figura 7.1. Estructura química del monómero HEI derivado de ibuprofeno y de los diferentes sistemas poliméricos preparados objeto de estudio de este trabajo.

Así, las principales conclusiones de este trabajo son:

1. Mediante reacción de esterificación tipo Steglich se consigue la preparación del monómero HEI, técnica no aplicada anteriormente y con la que se logra la optimización de dicha síntesis.
2. La polimerización del monómero HEI con el VI proporciona copolímeros de gradiente dada la diferente reactividad de éstos. La distribución de las unidades monoméricas a lo largo de las cadenas, junto con el carácter hidrófobo de HEI e hidrófilo del VI, confiere un carácter anfifílico a los copolímeros preparados, propiedad clave a la hora de estudiar su comportamiento en medio acuoso.
3. Mediante técnica de nanoprecipitación se consigue la preparación de nanopartículas a partir de los copolímeros p(HEI-co-VI) por un proceso de autoensamblado en el que las secuencias ricas en grupos HEI de carácter hidrófobo se sitúan en el interior de la micela y las secuencias ricas en grupos hidrófilos VI forman la cubierta de las mismas. Los estudios de DLS y las imágenes obtenidas mediante SEM y TEM muestran una distribución de tamaños de partícula unimodales entre 50 y 200 nm, dependiendo de la composición del copolímero de partida.
4. Las medidas de potencial zeta confirman la presencia de los grupos de VI formando la corteza hidrófila cargada electrostáticamente. Para todas las composiciones preparadas se obtienen valores de potencial zeta superiores a 30 mV y una relación carga/área que aumenta al aumentar el contenido en VI en el copolímero de partida. La estabilidad de las nanopartículas se comprueba al obtener resultados de tamaño y potencial zeta similares a los iniciales después de tres meses desde su preparación.

5. Como consecuencia de la desprotonación del imidazol al aumentar el pH del medio el tamaño de las partículas preparadas aumenta y disminuye el valor del potencial zeta. Gracias a la adición de un surfactante como el PVA se consigue evitar la agregación de las mismas, independientemente del valor de pH del medio.
6. A través del par de electrones no compartido del anillo del imidazol las nanopartículas de HEI y VI pueden formar complejos con metales como el Zn^{2+} , existiendo una clara dependencia con el pH del medio y la composición de las nanopartículas, de forma que cuanto mayor es el pH y mayor es el contenido en VI, mayor es la cantidad de metal complejado.
7. Los estudios de las nanopartículas poliméricas HEI-co-VI realizados con cultivos celulares pusieron de manifiesto la idoneidad de las mismas como sistemas antiinflamatorios. Estos sistemas produjeron una reducción significativa de la producción de óxido nítrico así como baja toxicidad.
8. La polimerización del monómero HEI con otros monómeros como el MMA o el AB mediante polimerización radical en disolución proporciona copolímeros hidrófobos, habiéndose obtenido un sistema, el p(HEI-co-AB-co-MMA) 70:10:20, que reúne una serie de requisitos para ser aplicado con éxito como recubrimiento de stents vasculares.
9. Los estudios de liberación de ibuprofeno realizados con todos los sistemas descritos en este trabajo (copolímeros de gradiente, nanopartículas y copolímeros hidrófobos), muestra una dependencia tanto del pH del medio como de la composición. En todos los casos los resultados obtenidos pueden ser explicados basándonos en un mecanismo de liberación análogo al “Progressive accessibility model” o

mecanismo “en cremallera”, de forma que al ir liberándose ibuprofeno los restos de HEI se convierten en HEMA, creando así dominios con mayor carácter hidrófilo en la zona que facilita la posterior liberación de unidades de HEI próximas.

10. La presencia de unidades de VI de carácter hidrófilo en los copolímeros y nanopartículas de HEI-VI proporciona valores de ibuprofeno liberado mayores a los obtenidos con los copolímeros hidrófobos, ya que dicho monómero crea también puntos de acceso a las moléculas de agua favoreciendo así la hidrólisis del fármaco.
11. Los copolímeros derivados de ibuprofeno preparados en este trabajo están siendo actualmente evaluados como sistemas antiinflamatorios en dispositivos biomédicos avanzados. Actualmente los avances más significativos en este sentido han sido protegidos mediante patente española ES2391187B1 en la que ha participado una empresa líder en el sector biotecnológico con el fin de desarrollar formulaciones comerciales innovadoras que, en caso de materializarse, supondrán un claro avance en el tratamiento de los procesos inflamatorios graves asociados al empleo de dispositivos vasculares.

Anexo I

TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE POLÍMEROS Y NANOPARTÍCULAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO

I.1 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

La caracterización espectroscópica mediante Resonancia Magnética Nuclear de protón (^1H -RMN) y carbono-13 (^{13}C -RMN) así como por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) constituyen técnicas ampliamente utilizadas. Permiten identificar los intermedios de reacción y los polímeros sintetizados así como conocer la composición química de los productos de tal modo que aplicadas a la ciencia de materiales nos permiten determinar de manera precisa la estructura de polímeros, la identificación de sus componentes y el análisis de los grupos funcionales. La asignación de las bandas características de los polímeros se realiza de acuerdo con la bibliografía así como con tablas de asignación teórica.

I.2 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑOS (SEC). DETERMINACIÓN DE PESOS MOLECULARES

Debido a las características propias de los polímeros sintéticos en cuanto a su formación, y a diferencia de los compuestos formados por moléculas discretas, éstos están generalmente formados por una mezcla de moléculas que han alcanzado diferente grado de polimerización y en consecuencia, diferente peso molecular, por lo que se consideran materiales polidispersos. Por tanto, para los polímeros sólo es posible determinar un peso molecular promedio, de un peso estadístico relativo a todas las moléculas presentes en la muestra. La explicación de esta polidispersidad reside en las variaciones estadísticas presentes en el propio proceso de polimerización.

La distribución de pesos moleculares puede definirse mediante diferentes promedios, de los cuales los más característicos son el Peso Molecular Promedio en Número (M_n) y el Peso Molecular Promedio en Peso (M_w).

El M_n se define como el peso total de todas las moléculas en una muestra de polímero (w) en relación al número total de moléculas presentes, cuya expresión matemática se recoge en la Ecuación I.1,

$$M_n = \frac{w}{\sum N_x} = \frac{\sum N_x M_x}{\sum N_x} \quad (\text{Ec. I.1})$$

donde los sumatorios representan todas las especies poliméricas de diferente tamaño desde $x = 1$ hasta $x = \infty$ unidades y N_x es el número de moléculas cuyo peso es M_x .

Por su parte M_w se puede resumir de manera análoga según la Ecuación I.2,

$$M_w = \frac{\sum N_x M_x^2}{\sum N_x} \quad (\text{Ec. I.2})$$

El cociente de ambos promedios (M_w/M_n) se denomina Índice de Polidispersidad (IP), y proporciona una idea de la amplitud de la curva de distribución de pesos moleculares o polidispersidad del polímero, característica que determina sus propiedades. Para todos los polímeros el valor de IP es siempre mayor que uno y aumenta con la polidispersidad del material.

La técnica más utilizada para la determinación de la distribución de pesos moleculares en polímeros es la Cromatografía de Exclusión por Tamaños (SEC, Size Exclusion Chromatography), la cual nos proporciona información de la distribución de pesos moleculares que se forman durante

la reacción de polimerización. Esta técnica se basa en la separación de moléculas en función de su tamaño molecular en disolución al pasar a través de una serie de columnas rellenas de un material, normalmente geles entrecruzados de estireno/divinilbenceno o sílice, de tamaño de partícula estrecho y distribución de tamaños de poro controlada en el rango de las moléculas que se quieren separar. El soporte cromatográfico actúa como un tamiz molecular, de manera que la retención de las moléculas es función de su tamaño, eluyendo en primer lugar las de mayor tamaño, ya que no se introducen en los poros del relleno. Por último, mediante un sistema de detección adecuado (índice de refracción, espectroscopia UV, entre otros), se puede medir la cantidad de polímero que pasa a través de la columna en función del tiempo. Con esta técnica se pueden fraccionar polímeros según su tamaño molecular, así como obtener la curva de la distribución de pesos moleculares.

Esta técnica presenta el inconveniente que se trata de una técnica relativa que no permite determinaciones absolutas de pesos moleculares, sino que es preciso establecer una curva de calibrado a partir de patrones monodispersos de peso molecular conocido, y a partir de ella, obtener los pesos moleculares relativos de las muestras. Sin embargo, en la mayoría de los casos no existen patrones de los polímeros de estudio, por lo que se suele recurrir a patrones comerciales de polímeros con un volumen hidrodinámico parecido, o al menos con estructura química semejante a la muestra problema. Por todo ello, hay que considerar los resultados obtenidos como pesos moleculares aparentes.

I.3 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO, DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES TÉRMICAS

Las técnicas calorimétricas han sido y siguen siendo en la actualidad ampliamente utilizadas en la caracterización de materiales. Éstas se basan en la medida de una propiedad física o mecánica del material al variar la temperatura.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC, Differential Scanning Calorimetry) permite el estudio de aquellos procesos en los que se produce una variación entálpica, por ejemplo, la determinación de calores específicos, puntos de ebullición y fusión, pureza de compuestos cristalinos, entalpías de reacción y determinación de otras transiciones de primer y segundo orden. Se basa en la medida de flujo de calor entre una muestra y una referencia en función del tiempo o la temperatura. Debido a que la mayoría de los cambios físicos o químicos tienen lugar con un cambio de entropía, entalpía y/o energía libre de Gibbs, éstos pueden ser evaluados por calorimetría detectando el calor intercambiado en cada transición.¹

Tanto los polímeros amorfos, como las zonas amorfas de los polímeros parcialmente cristalinos, muestran una transición térmica denominada transición vítrea y una temperatura asociada a esa transición denominada temperatura de transición vítrea (T_g).² La determinación de esta transición nos da una idea acerca de la flexibilidad de cadena. Por debajo de la T_g el polímero se encuentra en su estado vítreo, rígido y quebradizo, en el que los movimientos moleculares están “congelados”. Al llegar a la transición vítrea las macrocadenas poseen suficiente energía térmica para moverse al azar, aumenta el volumen libre y tiene lugar un salto en la capacidad calorífica a la temperatura T_g . Esta transición está asociada a un fenómeno de relajación por lo que su determinación depende en gran medida de la

estructura química del polímero y de las condiciones experimentales en que se realiza, entre ellas la velocidad de calentamiento.

I.4 DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA, DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

Uno de los métodos más comunes utilizados para caracterizar nanopartículas y coloides es la Dispersión de Luz Dinámica (DLS, Dynamic Light Scattering). Esta técnica consiste en medir la intensidad de un haz de luz láser dispersado al pasar por una suspensión coloidal. En dicha suspensión las partículas se encuentran en un continuo movimiento aleatorio denominado movimiento Browniano que se debe a las colisiones que sufren las partículas en suspensión con las partículas de disolvente que las rodean. Estas colisiones afectan de forma distinta a las partículas según el tamaño de las mismas, de forma que las más pequeñas se mueven más rápido que las más grandes.³

La relación entre el tamaño de partícula y su velocidad debido al movimiento Browniano se puede calcular mediante la relación de Stokes-Einstein,

$$D = \frac{k_b T}{3 \pi \eta x_H} \quad (\text{Ec. I.3})$$

donde k_b es la constante de Boltzman, T es la temperatura, η es la viscosidad, x_H es el radio hidrodinámico y D es el coeficiente de difusión. Según esta fórmula, un parámetro a controlar durante las mediciones es la temperatura, ya que influye en la viscosidad del medio y en el movimiento Browniano.

Para calcular el coeficiente de difusión (D), y por consiguiente el tamaño hidrodinámico, a partir de los datos experimentales obtenidos de las fluctuaciones de las nanopartículas es posible obtener la función de correlación $g^{(1)}(t)$,

$$g^{(1)}(t) = \exp \left\{ - \left[\frac{4 \Pi}{\lambda} \sin(\theta/2) \right]^2 \cdot D \cdot t \right\} \quad (Ec. I.4)$$

donde λ es la longitud de onda del láser utilizado y θ el ángulo al cual se realiza la medida.

Por lo tanto, con los datos experimentales y aplicando las ecuaciones anteriores es posible determinar el radio hidrodinámico de las partículas. Es importante resaltar que no obtenemos el tamaño real de la partícula, sino, como se acaba de decir, el tamaño hidrodinámico. Como las partículas están en movimiento, éstas pueden interaccionar con el disolvente, y por este motivo, el radio calculado es indicativo del tamaño aparente ya que tiene en cuenta los procesos de atracción y asociación con moléculas del disolvente, y de allí su nombre, "radio hidrodinámico". El grosor de esta capa dependerá de varios factores, los cuales son necesarios controlar a la hora de hacer las medidas, como por ejemplo la conductividad eléctrica del medio, fuerza iónica, etc.⁴

I.5 POTENCIAL ZETA

Las partículas coloidales dispersas en una solución acuosa presentan una carga eléctrica neta en su superficie. El modelo de la doble capa⁵ se usa para visualizar la atmósfera iónica en la proximidad del coloide cargado y

para explicar cómo actúan las fuerzas eléctricas de repulsión. Si suponemos que la partícula coloide dispersa en la disolución tiene carga negativa, ésta se rodeará de iones positivos formando una capa de disolvente adyacente a la superficie del coloide. Esta capa de contraiones se denomina capa compacta o capa de Stern. Fuera de esta capa fija, la concentración de contraiones va disminuyendo con la distancia, formando un área nebulosa o difusa, hasta que se logra un equilibrio con la concentración de los contraiones en el seno de la disolución. Esta región se conoce como capa difusa y su espesor depende de la concentración iónica y propiedades eléctricas del medio. Son los contraiones de la capa de Stern y los de la capa difusa los que juntos forman la doble capa, la cual consiste por tanto en una región interna que incluye iones unidos fuertemente a la superficie y una región difusa donde la distribución de iones se determina por un balance de fuerzas electrostáticas y movimiento termal aleatorio. El espesor de esta doble capa depende del tipo y concentración de los iones de la disolución. Así, el coloide cargado y su atmósfera cargada de signo contrario producen un potencial eléctrico relativo en la disolución, el cual tiene un valor máximo en la superficie de la partícula y disminuye gradualmente con la distancia, aproximándose a cero fuera de la capa difusa (Figura I.1).

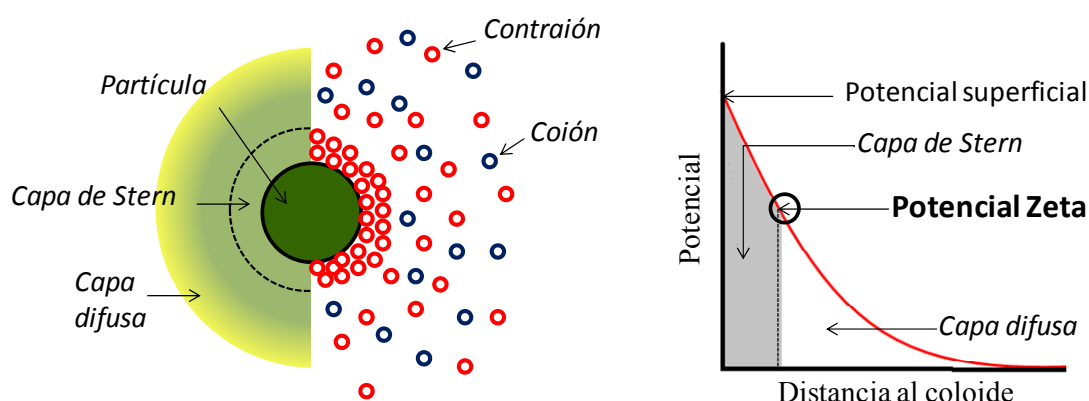


Figura I.1. Representación de la variación del potencial en función de la distancia a la superficie de la partícula.

Aunque la carga de la superficie y su potencial no pueden medirse, un punto de particular interés es el potencial donde se unen la capa difusa y la de Stern. Este potencial es conocido como el potencial zeta (ζ) y es el único experimentalmente accesible, aunque no de forma directa, sino mediante modelos teóricos que lo relacionan con magnitudes medibles. Así, el potencial zeta es el término que se utiliza para definir el potencial electrocinético de un sistema coloidal y puede definirse como el potencial eléctrico que se produce entre el medio y la capa de fluido estacionario (capa de Stern) que se forma alrededor de la partícula en suspensión debido a sus propiedades iónicas.⁵

El principio de determinación del potencial zeta se basa en la aplicación de un campo eléctrico controlado por medio de electrodos inmersos en una muestra en suspensión. De este modo las partículas cargadas se moverán hacia el electrodo de polaridad opuesta, tal y como se representa en la Figura I.2. La velocidad que adquiere la partícula se denomina movilidad electroforética (U) y depende de la intensidad del campo eléctrico aplicado, la constante dieléctrica del medio y del potencial zeta de la partícula.

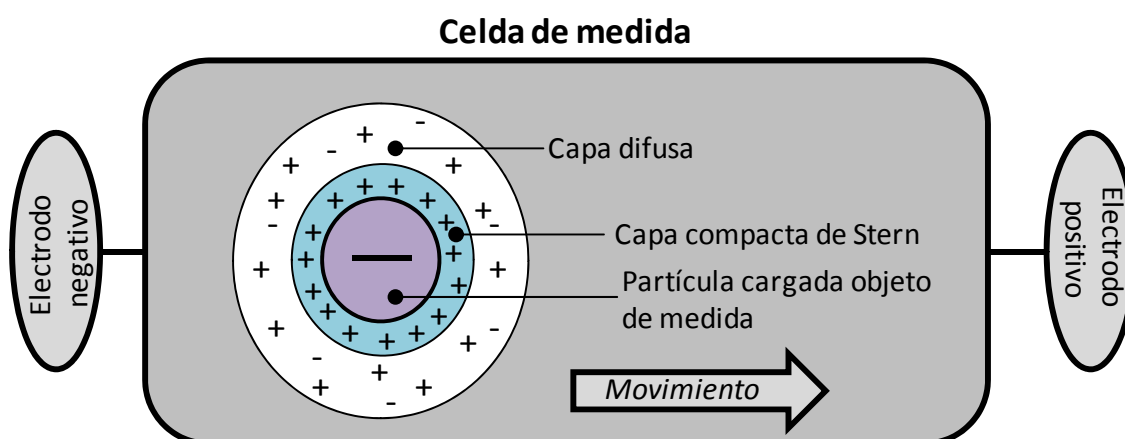


Figura I.2. Representación de celda de medida del potencial zeta y del modelo de doble capa de la partícula en suspensión.

En el presente trabajo el potencial zeta se calcula a partir de medidas de movilidad electroforética, para lo cual el equipo aplica un campo eléctrico a la disolución y mide la velocidad a la que las partículas se mueven mediante velocimetría láser de efecto Doppler. Esta técnica se basa en que los electrodos positivo y negativo son cambiados de polaridad, de tal forma que las partículas se mueven continuamente de un electrodo hacia el otro. La muestra que está entre los electrodos es iluminada con un rayo láser y la dispersión de este rayo láser es usada para determinar la desviación Doppler causada por el movimiento de las partículas. Con la desviación Doppler medida y las propiedades ópticas y geométricas del dispositivo de medición conocidos, el equipo determina la movilidad electroforética.

Una vez obtenida la movilidad electroforética, como ya se ha mencionado, ésta se puede relacionar con el potencial zeta a través de distintos modelos teóricos. El modelo más simple es el desarrollado por Smoluchowski,⁵ en el que la movilidad electroforética y el potencial zeta se relacionan a través de la Ecuación I.3, aplicable si se trabaja con disoluciones acuosas y con concentraciones bajas de electrolitos,

$$\zeta = \frac{U \cdot \eta}{\varepsilon} \quad (\text{Ec. I.5})$$

donde ζ es el potencial zeta, U es la movilidad electroforética, η es la viscosidad del medio y ε es la constante dieléctrica del medio.

La determinación del potencial zeta es de gran importancia ya que su valor está relacionado con la estabilidad de la dispersión y la magnitud de la carga eléctrica de las partículas. Un alto valor de potencial zeta indica que las partículas en suspensión son fuertemente repelidas entre sí, impidiendo su agregación y precipitación, mientras que cuando su valor es bajo la atracción entre partículas supera la repulsión y la dispersión precipita.^{5,7}

I.6 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Barrall, E.M.; Jonson J. F. *Techniques and Methods of Polymer Evaluation*. Marcel Dekker, Inc. **1970**. Nueva York.
- ² Richardson, M.J. *Comprehensive Polymer Science: the Synthesis, Characterization, Reactions and Applications of Polymers*. Pergamon Press. **1989**. Oxford.
- ³ Xu, R. *Particle characterization: light scattering methods*. Kluwer Academic Publishers. **2002**. Nueva York.
- ⁴ Bian, S.W.; Mudunkotuwa, I.A.; Rupasinghe, T.; Grassian, V.H. *Langmuir*, **2011**, 27, 6059-6068.
- ⁵ Hunter, R.J. *Zeta potential in colloid science: principles and applications*. Academic Press. **1981**.
- ⁶ Lyklema, J. *Fundamentals of interface and colloid stability*. Academic Press. **2002**.
- ⁷ ASTM. *Zeta potential of colloids in water and waste water*. **1985**.

Anexo II

SUMMARY AND CONCLUSIONS

BIACTIVE POLYMERIC SYSTEMS CONTAINING IBUPROFEN

INTRODUCTION

Inflammatory diseases are the most frequent pathologies in the society and, in general, the treatment is based on the oral or systemic application of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). New anti-inflammatory therapies approaches consist in the use of chelating agents (low molecular or macromolecular) containing zinc binding sites in order to act as MMPs inhibitors. MMPs are enzymes implicated in the digestion and remodeling of the extracellular matrix during the course of several inflammatory diseases. However there are not described any treatment which combines in one single therapeutic component both strategies of a NSAID controlled release system with a specific tissue inhibitors of MMPs.

Ibuprofen is a well-known NSAID widely used in anti-inflammatory therapy and has been incorporated covalently in different macromolecular drug delivery systems and polymer drug conjugates for the enhancing of local bioavailability and vectorization. On the other hand, imidazole-based ligands are hydrophilic ionizable compounds with high chelating capacity of different metals cations, which have demonstrated MMPs inhibition capacity by zinc chelation mechanisms.

Thus, tailor-made macromolecular systems able to act as bioactive anti-inflammatory materials combining both functionalities, the controlled delivery of ibuprofen and the inhibition of the MMPs activity by chelating Zn^{2+} ions, may be very attractive targets for anti-inflammatory therapy and biomedical applications. For this proposal, amphiphilic gradient copolymers have attracted a great deal of attention in terms of their capability to form various types of nanosized entities through self-assembling mechanisms, as those represented by micellar structures, in which a targeted hydrophobic

drug can be isolated from the surrounding media, enhancing its biostability and the control on its therapeutic action.

Other interesting application of polymer drug conjugates is their use as coating of vascular stents, due to the reduction of restenosis and inflammatory process associated to the placement of the device. Several studies have demonstrated excellent results of vascular stents coated with polymeric systems capable to deliver anti-inflammatory drugs in the precise site and dosage. Thus the development of novel macromolecular ibuprofen derivatives constitute an exciting and promising approach to enhance the performance of referred medical devices and therefore contributing to increase the quality and expectancy of life for infarcted patients.

AIMS

The objectives of this work are: the preparation and characterization of amphiphilic gradient copolymers derivative of the ibuprofen acrylic monomer (HEI) and 1-vinylimidazole (VI); the formation and study the *in vitro* behavior of self-assembled nanoparticles containing the drug to be used as zinc quelating and ibuprofen delivery vehicles for biomedical applications; and the preparation of hydrophobic copolymers based on HEI for coating vascular stents and their characterization *in vitro*.

RESULTS AND DISCUSSION

The acrylic derivative of ibuprofen, 2-([2-4-(2-methylpropyl)phenyl]propionylloxy) ethyl methacrylate (HEI) was synthesized in a single step carbodiimide-catalyzed Steglich esterification reaction between the OH groups of HEMA and the carboxylic group of ibuprofen.

HEI based copolymers were synthesized in presence of hydrophilic VI or hydrophobic (meth)acrylate monomers such as MMA and BA. Self-assembled nanoparticles based on p(HEI-co-VI) copolymers were produced by precipitation method while homogeneous coatings based on p(HEI-co-AB-co-MMA) systems were applied on vascular stents. The main results of each system studied are:

- **Gradient copolymers of HEI and VI:** high molecular weight copolymers based on hydrophilic VI moieties and hydrophobic ibuprofen acrylate conjugated residues were prepared by free radical polymerization. Copolymers were achieved from the different feed compositions of 20, 50, and 80 mol%, obtaining the named copolymers G37, G60 and G92 respectively.

The reactivity ratios values for the monomer species ($r_{\text{HEI}} = 5.575$ and $r_{\text{VI}} = 0.012$) determined by *in situ* ^1H -NMR indicate the higher reactivity of the HEI monomer in compare with the VI monomer showing that the polymeric backbone grows with a gradient distribution of the molecular units along the macromolecular chains, which led to the formation of a enriched hydrophilic VI segment and hence yielded an amphiphilic gradient microstructure of hydrophilic VI and hydrophobic HEI segments. Such difference in reactivity play also a key role on the M_n and PI index giving values lower than the classical free radical mechanism. These values are expected according with reported free radical copolymerization reactions of VI and (meth)acrylate monomers as a consequence of the deviation from classical mechanisms due to a partial degradative addition reaction between the imidazole monomeric units and propagating radicals.

- **Polymeric nanoparticles of HEI and VI:** the amphiphilic nature of the p(HEI-co-VI) copolymers and their specific microstructure led to the formation of well defined micelles in aqueous media through self-assembled

mechanisms, whereas imidazole rich sequences are located preferentially at the hydrated outer shell, but also in a gradual display along the more hydrophobic core of HEI.

The hydrodynamic diameter, polydispersity size distribution index and zeta potential of the nanoparticles, determined by dynamic light scattering (DLS), were strongly dependent on the polymer composition, where the nanoparticle size increased with the content of ibuprofen, while the NP concentration did not cause such an effect in the hydrodynamic parameters. Zeta potential values show positively charged surfaces for all the composition that confirm the presence of protonated imidazole units onto the micellar surface.

The *in vitro* behavior of the polymeric nanoparticles showed pH dependence in terms of the size, surface charge and zinc chelating capacities due to the ionizable character of the imidazole units. The nanoparticles metal chelating capacity with metal ions as Zn^{2+} make these systems as potential modulators of some metal dependent enzymes such as MMP, leading to a reduction in the inflammatory responses mediated by these enzymes.

Anti-inflammatory activities in nitric oxide inhibition assay on macrophages cells were observed as a function of the composition of the corresponding copolymer systems.

Ibuprofen release experiments of p(HEI-co-VI) gradient copolymers and nanoparticles indicate a sustained release dependent on both the ibuprofen content and the presence of hydrophilic VI moieties that facilitate water diffusion to the drug moieties in an analogous manner to the called “progressive accessibility model mechanism”, that assumes that the hydrolysis of the drug is not only a consequence of an obvious increase of the

ibuprofen content but is also strongly dependent on pH and monomer triads distribution.

- **Hydrophobic copolymers:** different copolymers of HEI and hydrophobic monomers such as butyl acrylate and methyl methacrylate were prepared and characterized. Wettability, thermal and microstructural properties of the copolymers showed a strong dependence with copolymer composition. Among all the copolymers studied, the named H5 [p(HEI-co-MMA-co-AB-co-MMA) 70:10:20], showed an outstanding performance in terms of chain flexibility, stability, hemo-compatibility and good adhesion to the surface of metallic stents, consequence of its tailored physical-chemical properties in terms of water contact angle (84.0 °), solid surface energy (32.4 mN/m), Tg (25 °C) and molecular weight (Mw 133000 Da). Moreover biocompatible studies on H5 showed low cytotoxicity and good adherence and proliferation *in vitro* of different human cell linages.

CONCLUSIONS

Copolymers based on ibuprofen acrylate conjugated residues were prepared by free radical polymerization in the presence of hydrophilic 1-vinylimidazole or hydrophobic (meth)acrylate monomers such as methyl methacrylate and buthyl acrylate. Depending on the composition, tuneable properties can be achieved and therefore different applications are explored. The p(HEI-co-VI) gradient copolymers are presented for the preparation of nanosized self-assembled ibuprofen delivery systems with enhanced biostability and tailored release profiles. Moreover, their Zn²⁺ chelating capacity makes these systems as potential MMPs inhibitor, constituting a new step to improve anti-inflammatory therapies. Moreover, statistical p(HEI-co-AB-co-MMA) copolymers showed outstanding features for the preparation of hydrophobic coatings that can be applied onto vascular devices.

